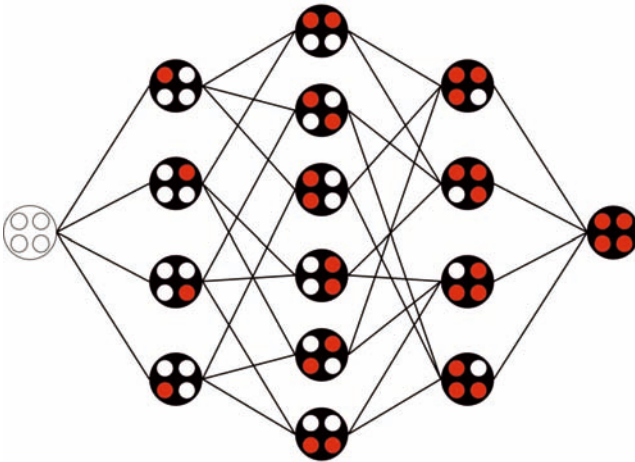


Modell und Berechnung von Konzentrations-  
Inhibitionskurven hoch- und niedrigpotenter  
Substanzen am TTX-resistenten Natriumkanal  
der erwachsenen Ratte

---

**Heiko Kerkmann**



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Zahnheilkunde**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2013

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2013

© 2013 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen

Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Modell und Berechnung von Konzentrations-  
Inhibitionskurven hoch- und niedrigpotenter  
Substanzen am TTX-resistenten Natriumkanal  
der erwachsenen Ratte**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Zahnheilkunde  
des Fachbereichs Medizin der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Dr. med. Heiko Kerkmann**

aus Mülheim an der Ruhr

Gießen 2012

Aus der Abteilung für

Anästhesiologie und operative Intensivmedizin

am Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. M. A. Weigand

Gutachter: PD Dr. med. M. E. Bräu

Gutachter: Prof. Dr. med. S. Rohrbach

Tag der Disputation: 04.07.2013

Meiner Familie gewidmet.



# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b><u>1</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>1</u></b>
1.1	PHARMAKOLOGIE	1
1.2	PHARMAKOKINETIK	1
1.3	PHARMAKODYNAMIK	2
1.4	NATRIUMKANAL-BLOCKIERENDE PHARMAKA	3
1.5	KOOPERATIVITÄT	7
1.6	LINEARISIERUNGSVERFAHREN	9
1.7	PROBLEMBESCHREIBUNG	11
1.8	FRAGESTELLUNG	12
<b><u>2</u></b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b><u>13</u></b>
2.1	ARBEITSTECHNIK UND SUBSTANZEN	13
2.1.1	DIE PRÄPARATION	13
2.1.2	PIPETTEN	14
2.1.3	NÄHRMEDIUM	14
2.1.4	KRISTALLINE LÖSUNGEN	15
2.1.5	„PATCH-CLAMP“-TECHNIK	16
2.1.6	SUBSTANZEN	18
2.2	MODELLE DER NATRIUMSTROMBLOCKADE	19
<b><u>3</u></b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b><u>27</u></b>
<b><u>4</u></b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b><u>33</u></b>
4.1	DER LOKALANÄSTHETIKAREZEPTOR AM NATRIUMKANAL	33
4.2	BLOCKIERUNGSMODELLE FÜR DIE STEILERE KONZENTRATIONS-INHIBITIONSKURVE	38
<b><u>5</u></b>	<b><u>AUSBLICK</u></b>	<b><u>45</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>46</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>SUMMARY</u></b>	<b><u>48</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b><u>50</u></b>
8.1	ANHANG I: KONZENTRATION-INHIBITIONSKURVEN UND DIE SUMME DER ABWEICHUNGSQUADRATE – „SUM OF SQUARES (SS)“ IN ABHÄNGIGKEIT DER ANZAHL DER BINDUNGSSTELLEN FÜR ALLE UNTERSUCHTEN SUBSTANZEN.	50
8.1.1	AMITRIPTYLIN	50
8.1.2	ANILIN	50
8.1.3	BENZOCAIN	51
8.1.4	BUTAMBEN	51
8.1.5	DIPHENYLHYDRAMIN	51
8.1.6	DYCLONIN	52
8.1.7	ETHYLBENZYLAMIN	52
8.1.8	ETIDOCAIN	52
8.1.9	LIDOCAIN	53

8.1.10	MEPERIDIN	53
8.1.11	MEPIVACAIN	53
8.1.12	METHYLBENZYLAMIN	54
8.1.13	MEXILETIN	54
8.1.14	OCTANOL	54
8.1.15	OXYBUPROCAIN	55
8.1.16	PHENYLBUTYLAMIN	55
8.1.17	PHENYLETHYLAMIN	55
8.1.18	PHENYLETHYLDIAMIN	56
8.1.19	PHENYLMETHYLAMIN	56
8.1.20	PHENYLPROPYLAMIN	56
8.1.21	PROCAIN	57
<b>8.2</b>	<b>ANHANG II: STRUKTURFORMELN UND BIOPHYSIKALISCHE PARAMETER DER IN DER ARBEIT UNTERSUCHTEN SUBSTANZEN.</b>	<b>58</b>
<b>9</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>62</b>
<hr/>		
	<b>ERKLÄRUNG ZUR SICHERUNG GUTER WISSENSCHAFTLICHER PRAXIS</b>	<b>65</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>66</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>67</b>



## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

<b>Abbildung 1:</b> Wirkstärke und maximale Wirkung	3
<b>Abbildung 2:</b> Linear und logarithmisch eingeteilte Konzentrations-Inhibitionskurve	6
<b>Abbildung 3:</b> Darstellung von Kooperativität in Konzentrations-Inhibitionskurven	8
<b>Abbildung 4:</b> Hill-Plot	9
<b>Abbildung 5:</b> Scatchard-Plot	10
<b>Abbildung 6:</b> Lineweaver-Burk-Plot	10
<b>Abbildung 7:</b> Güte der Kurvenanpassung am Beispiel Benzocain	11
<b>Abbildung 8:</b> Das „Voltage-Clamp“-Prinzip, dargestellt für einen „Whole-Cell-Patch“.	17
<b>Abbildung 9:</b> Modell der Natriumkanalblockade für eine Bindungsstelle	19
<b>Abbildung 10:</b> Modell der Natriumkanalblockade für zwei Bindungsstellen	20
<b>Abbildung 11:</b> Modell der Natriumkanalblockade für vier Bindungsstellen, Szenario 1	21
<b>Abbildung 12:</b> Modell der Natriumkanalblockade für vier Bindungsstellen, Szenario 2	22
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung der aus den vier Gleichungen resultierenden Kurven	24
<b>Abbildung 14:</b> Methode der kleinsten Abweichungsquadrate	25
<b>Abbildung 15:</b> Beispiele für Konzentrations-Inhibitionskurven und die Summe der Abweichungsquadrate in Abhängigkeit der Zahl der Bindungsstellen (n) in Gleichung D	29
<b>Abbildung 16:</b> Zahl der Bindungsstellen nach Gleichung D in Abhängigkeit des Verhältnisses von tonischer zu "use-dependent" Blockade	32
<b>Abbildung 17:</b> Persistenz der "klassischen" Lokalanästhetika-Bindungsstelle	33
<b>Abbildung 18:</b> Vergleich der Konzentrations-Inhibitionskurven von Lidocain, Benzocain und Butamben	41
<b>Abbildung 19:</b> Veränderung des Verhältnisses von $K_D$ zu $IC_{50}$ in Abhängigkeit der Zahl der Bindungsstellen (n) für das Modell der Gleichung D	42

## GLEICHUNGEN UND TABELLEN

Gleichung A	5, 19, 23
Gleichung B	8, 20, 23
Gleichung C	22, 23
Gleichung D	23

<b>Tabelle 1:</b> Ionenzusammensetzung der verwendeten Extrazellulärlösungen.	15
<b>Tabelle 2:</b> Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Substanzen und deren Bezugswege.	18
<b>Tabelle 3:</b> Formeln zur Berechnung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ )	23
<b>Tabelle 4:</b> Einteilung der Substanzen nach der Zahl der potentiellen Bindungsstellen	30
<b>Tabelle 5:</b> Ergebnisse der Berechnungen der Gleichungen A, B, C und D	37

# 1 Einleitung

## 1.1 *Pharmakologie*

Die Pharmakologie ist die Lehre von den Wechselwirkungen zwischen körperfremden Stoffen und Organismen. Der Begriff Pharmakologie stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus den Vokabeln „pharmakon“ (φάρμακον) und „logos“ (λόγος) zusammen. „Logos“ hat die Grundbedeutung Wort, Rede oder Sinn und bezeichnet als Wortendung „-logie“ die Lehre einer Sache.

„Pharmakon“ wird in der Regel mit Arznei (-mittel) übersetzt, hat jedoch im Griechischen die beiden gegenteiligen Bedeutungen Heilmittel und Gift. Der begriffliche Gegensatz klärt sich durch die Tatsache, dass vielen Heilmitteln Gifte zugrunde liegen. Als Beispiel sei hier Colchicin, das Gift der Herbstzeitlosen, welches in der Behandlung des akuten Gichtanfalls zum Einsatz kommt genannt. Ein weiteres Präparat ist Digitalis, das Gift des Fingerhutes, das seit über 200 Jahren in der Therapie der Herzinsuffizienz verwendet wird. Philippus Theophrastus Aureolus Bombastus von Hohenheim (1493 – 1541), besser bekannt als Paracelsus, formulierte schon 1538 in seiner dritten Verteidigungsrede „Dosis sola facit venenum“ – Allein die Dosis macht das Gift (Huser J., 1589).

Damals wie heute ist es wichtig Medikamente vor ihrem klinischen Einsatz genau zu untersuchen. Für eine sichere Anwendung ist die Kenntnis der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik eines Wirkstoffs unerlässlich.

## 1.2 *Pharmakokinetik*

Die Vorgänge, denen eine Substanz im Organismus unterliegt, untersucht und beschreibt die Pharmakokinetik. Unterscheiden lassen sich die Phasen der Freisetzung (Liberation), Aufnahme (Absorption), Verteilung (Distribution), Verstoffwechselung (Metabolismus) und Ausscheidung (Exkretion). Diesbezüglich müssen beispielsweise folgende Fragen für den effektiven klinischen Einsatz geklärt sein: Wie schnell löst sich eine Tablette in welchem Abschnitt des Magen-Darmtraktes? Wo wird das Medikament, in welcher Geschwindigkeit, resorbiert? In welchen Geweben verteilen sich der Wirkstoff und seine Metaboliten? Wo entfaltet

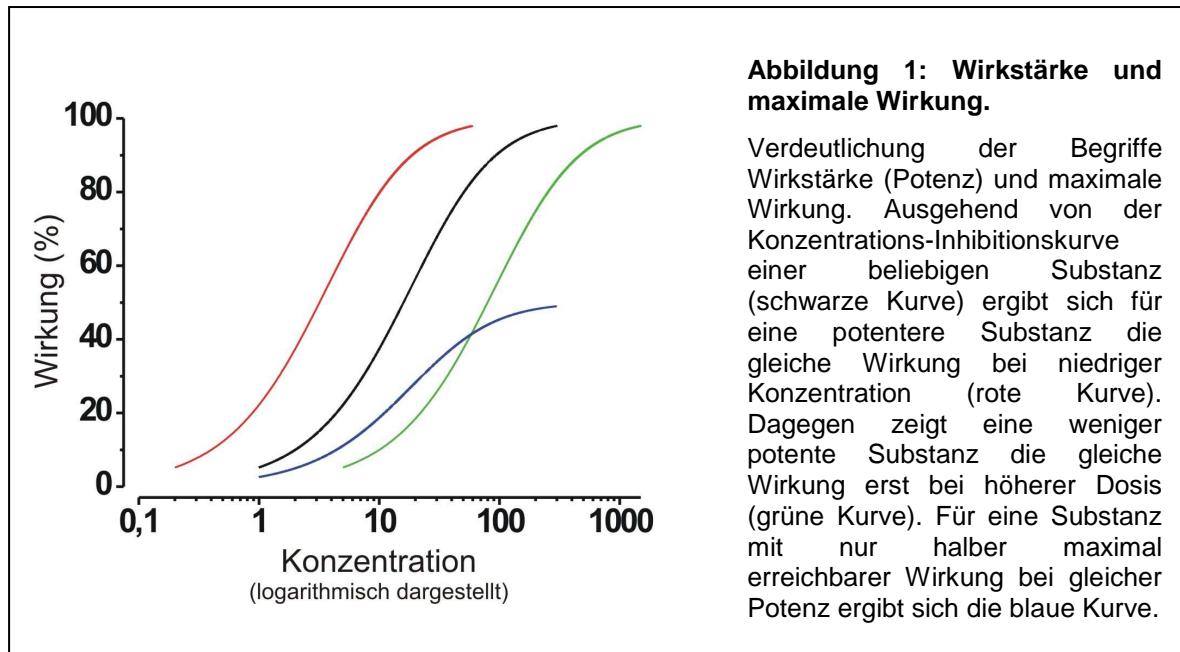
die Substanz ihre Wirkung, ehe sie abgebaut oder inaktiviert und über Galle, Stuhl oder Urin ausgeschieden wird?

Der Begriff Pharmakokinetik und viele Grundlagen, wie die Fläche unter der Kurve („Area under the curve“) gehen auf den Kinderarzt Friedrich Hartmut Dost zurück, der in der Zeit von 1960 – 1975 die Gießener Universitäts-Kinderklinik leitete. 1953 veröffentlichte er das erste Lehrbuch über die Pharmakokinetik „*Der Blutspiegel*“. Grundlage seiner Überlegungen war die Erkenntnis, dass Dosisempfehlungen für Arzneimittel nicht auf alleiniger Basis des Körpergewichtes von Erwachsenen auf Kinder umgerechnet werden dürfen (Dost F. H., 1953).

### **1.3 Pharmakodynamik**

Die Pharmakodynamik ist die Lehre von den Einflüssen einer Substanz auf den Organismus. Besondere Beachtung finden hierbei:

- das Wirkprofil, das den in der Regel spezifische Effekt an Organen oder biologischen Funktionen beschreibt.
- der Wirkmechanismus, der das Zustandekommen der beobachteten Wirkung auf molekularer Ebene zu erklären versucht. Mögliche Angriffspunkte sind Enzyme, Rezeptormoleküle, Ionenkanäle oder andere.
- die Dosis-Wirkungs-Beziehung, die entscheidend für den sicheren Einsatz von Medikamenten ist. So muss die minimale effektive Dosis sowie die toxische Dosis festgestellt werden, um die dazwischen liegende therapeutische Breite einer Substanz zu kennen.
- die Wirkstärke (Potenz) einer Substanz, welche die zum Erreichen eines Effektes benötigte Dosis ausdrückt. Hochpotente Substanzen benötigen für denselben Effekt eine geringere Dosis als niedrigpotente (s. Abbildung 1).
- die maximal erreichbare Wirkung, die substanzspezifisch ist. Wenn sie erreicht ist, kann durch weitere Steigerung der Dosis keine Zunahme des Effektes mehr resultieren (s. Abbildung 1).



#### 1.4 Natriumkanal-blockierende Pharmaka

Die Prinzipien der Pharmakodynamik gelten auch für die Wirkung Natriumkanal-blockierender Substanzen am Natriumkanal. In der vorliegenden Arbeit gilt das Interesse der Interaktion dieser Pharmaka mit dem Natriumkanal. Natriumkanäle finden sich als Proteine in der Zellmembran erregbarer Zellen, wie Nervenzellen und ermöglichen die Generierung von Aktionspotentialen. Als räumliche Struktur bilden sie transmembranöse Poren mit einer Selektivität für Natriumionen. In einer Arbeit von Sato *et al.* (Sato C. *et al.*, 2001) zeigt sich die Pore als glockenförmiges Molekül von circa 13,5 nm Höhe mit mehreren Hohlräumen im Inneren und vier bzw. acht Öffnungen nach extra- und intrazellulär. Da die Untersuchungen mit Kryo-Elektronenmikroskopie und Einzelpartikel-Bildanalyse durchgeführt wurden (Ueno Y. und Sato C., 2001) lassen sich keine Aussagen zur genauen Funktionsweise des Kanals treffen.

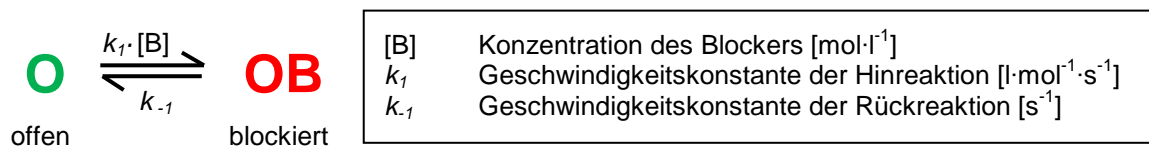
Wird eine Zelle mit der Gesamtheit, der in ihrer Membran vorhandenen Natriumkanäle einer Natriumkanal-blockierenden Substanz ausgesetzt, treffen die Blockermoleküle mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit auf eine Stelle des Natriumkanalmoleküls, an welche sie binden können. Verschiedene Faktoren, wie Konzentration und Temperatur, beeinflussen die Wahrscheinlichkeit mit der diese Bindung stattfindet. Ist ein Blockermolekül eine Bindung mit dem

Natriumkanalprotein an einer, für den Natriumdurchfluss kritischen Stelle, eingegangen, kommt es zu einem Sistieren des Natriumstromflusses durch diesen einzelnen Kanal.

Bei der Bindung zwischen Natriumkanal und blockierendem Molekül handelt es sich aber nicht um eine kovalente Bindung, sondern um Wasserstoffbrückenbindungen, polare Bindungen oder Ionenbindungen. Diesen gemein ist die, im Vergleich zu einer kovalenten Bindung, viel geringere Bindungsenergie. In der Regel nach wenigen Millisekunden löst sich das Blockermolekül vom Natriumkanal und gibt ihn damit für den Stromfluss wieder frei. Finden statistisch betrachtet gleich viele Bindungen und Lösungen zwischen Natriumkanälen und Blockermolekülen statt, ist ein dynamisches Gleichgewicht erreicht.

Die Beziehung zwischen offenem, nicht blockierten Natriumkanal und dessen Blockierung durch ein Blockermolekül kann mit Hilfe des Massen-Wirkungsgesetzes beschrieben werden, das eine Gesetzmäßigkeit für die quantitative Behandlung von Gleichgewichtsreaktionen festlegt. In seiner ursprünglichen Fassung von Peter Waage und Cato Maximilian Guldberg aus dem Jahr 1867 lautet es: „Die chemische Wirkung eines Stoffes ist seiner aktiven Masse proportional.“ (Lautenschläger K. - H. *et al.*, 2005).

Hiernach lässt sich das Binden einer blockierenden Substanz an einen offenen Natriumkanal durch die folgende Reaktionsformel ausdrücken, unter der zunächst vereinfachten Annahme, dass ein Blockermolekül ein Kanalmolekül blockiert.



Hierbei stellt O den offenen Kanal dar, B das Blockermolekül und OB den durch Bindung des Blockermoleküls blockierten Natriumkanal. Die Geschwindigkeit mit der die Bindung des Blockermoleküls an den Natriumkanal stattfindet ist abhängig von der Konstante ( $k_1$ ) und der Blockerkonzentration ( $[B]$ ). Die Geschwindigkeit der Bindungslösung ist unabhängig von der Blockerkonzentration und hat für jeden Blocker einen spezifischen Wert, der mit der Konstante  $k_{-1}$  beschrieben

wird. Bei einer bestimmten Blockerkonzentration ist die Geschwindigkeit der Bindung des Blockers ( $k_1 \cdot [B]$ ) gleich der Geschwindigkeit der Blockerlösung ( $k_{-1}$ ). Es stellt sich ein Gleichgewicht ein, bei dem die Wahrscheinlichkeit, dass der Kanal blockiert oder offen ist jeweils 50% beträgt. Ist die Blockerkonzentration gering, liegt das Gleichgewicht der Reaktionsgleichung auf der linken Seite, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass der Kanal blockiert ist, ist niedrig. Ist die Konzentration des Blockers hoch, so liegt das Gleichgewicht auf der rechten Seite und der Kanal ist mit hoher Wahrscheinlichkeit blockiert. Die Konzentration, bei der sich das Gleichgewicht einstellt, ist für jeden Blocker verschieden und wird hauptsächlich von der Gleichgewichtskonstanten der Rückreaktion ( $k_{-1}$ ) bestimmt. Die Konzentration kann aus den Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- ( $k_1$ ) und für die Rückreaktion ( $k_{-1}$ ) berechnet werden und wird als Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) bezeichnet. Es gilt:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

$K_D$	Dissoziationskonstante [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
$k_1$	Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$k_{-1}$	Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion [ $\text{s}^{-1}$ ]

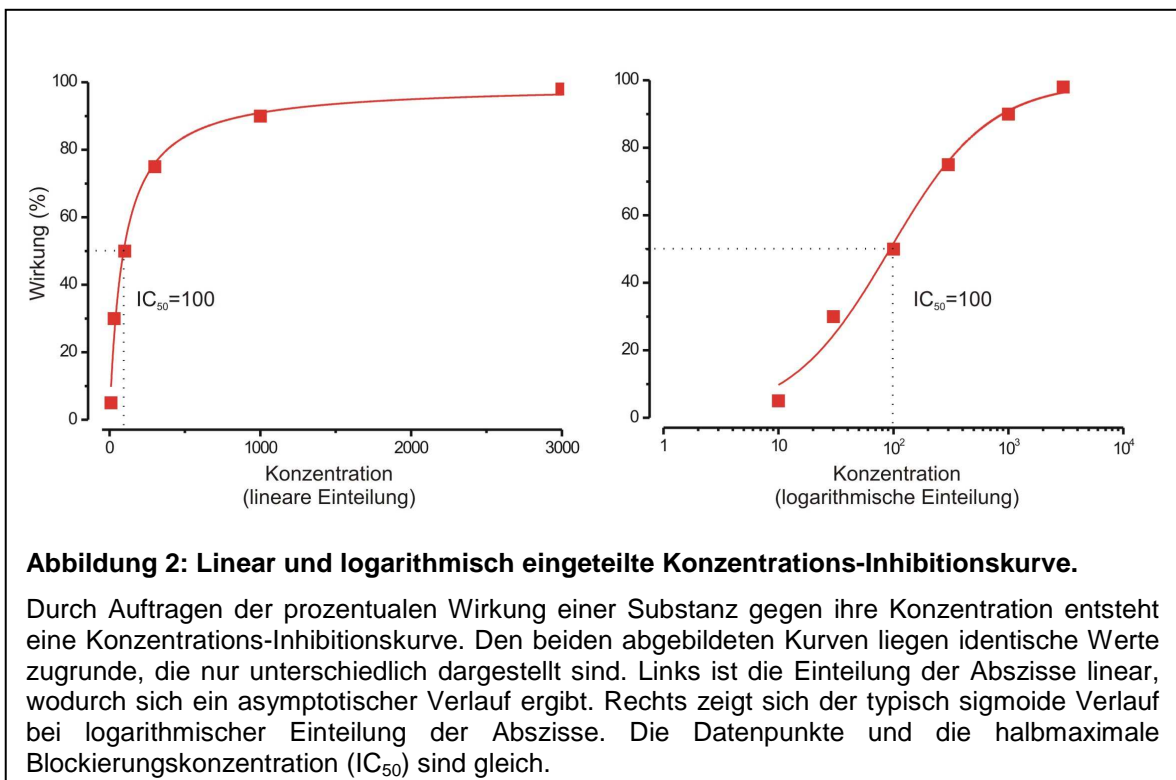
Summiert man alle Kanäle (mehrere Tausend), die zum Strom in einer Zelle beitragen, so ist bei der Applikation einer Blockerkonzentration, die der  $K_D$  des Blockers entspricht, die Hälfte des Stromes blockiert. Diese Konzentration wird daher auch als halbmaximale Blockierungskonzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) bezeichnet und ist für jeden Blocker charakteristisch.

Die mathematische Beziehung zwischen Blockerkonzentration ( $[B]$ ) und dem daraus resultierenden Block ( $f_B$ ) kann aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitet werden und ist nachfolgend dargestellt. Da im angenommenen Modell ein Blockermolekül ein Kanalmolekül blockiert, entspricht der Parameter  $\text{IC}_{50}$  im Zustand des dynamischen Gleichgewichts der im Massenwirkungsgesetz gebräuchlichen Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ).

Gleichung A:

$$f_B = \frac{[B]}{[B] + K_D}$$

Die halbmaximale Blockierungskonzentration  $IC_{50}$  ist dabei eine wichtige Kenngröße für den Blocker. Um die  $IC_{50}$  für einen Natriumstromblocker zu bestimmen, werden Konzentrations-Inhibitionskurven für diesen Blocker angefertigt, indem man verschiedene definierte Konzentrationen auf die Zelle appliziert und die jeweilige Blockade des Natriumstroms bestimmt. Trägt man die Natriumstromblockade gegen die Konzentration auf, so erhält man eine Konzentrations-Inhibitionskurve wie in Abbildung 2 beispielhaft dargestellt.



Geht man von einer 1:1 Stöchiometrie und einer vollständigen Blockade des Stromes bei hohen Blockerkonzentrationen aus, so können die Datenpunkte gut mit der oben erwähnten Gleichung A angepasst werden (s. Abbildung 2). Die  $IC_{50}$  entspricht hierbei wie oben schon erwähnt der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ).

Bei der Anpassung des einfachen Modells an die Datenpunkte kann aber nur die Lage der halbmaximalen Blockierungskonzentration auf der Konzentrationsachse angepasst werden, das Modell hat nur einen Freiheitsgrad. Alle anderen Eigenschaften der Kurve wie die Sättigung und vor allem die Steilheit werden hier nicht berücksichtigt. Dies ist aber für viele Blocker auch nicht notwendig, da ihr

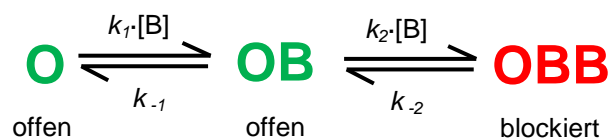


Blockierungsverhalten einer 1:1 Stöchiometrie entspricht und bei hoher Blockerkonzentration eine maximale Blockierung erreicht wird.

Bei einigen Blockern jedoch findet man eine deutlich steilere Konzentrations-Inhibitionskurve. Dieses Verhalten wird oft durch das Phänomen der Kooperativität erklärt.

### 1.5 Kooperativität

Die Grundannahme bei der Kooperativität ist, dass ein Blockermolekül pro Kanalmolekül nicht ausreicht, um die Wirkung zu entfalten, sondern dass noch ein zweites Blockermolekül binden muss. Durch die Bindung des ersten Blockermoleküls verändert sich dabei die Wahrscheinlichkeit für das Binden eines weiteren Blockermoleküls. Ebenfalls denkbar ist, dass sich die Wahrscheinlichkeit der Bindungslösung, also die Affinität der Blockermoleküle verändert oder eine Kombination aus beiden. Mögliche Ursache ist zum Beispiel eine Konformationsänderung im Natriumkanalmolekül durch Interaktion mit dem Blockermolekül. Eine erhöhte Affinität wird als positive, eine Verringerung der Affinität als negative Kooperativität bezeichnet. Die unterschiedliche Affinität der aufeinander folgenden Blockermoleküle wird in den nicht einheitlichen Geschwindigkeitskonstanten ( $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_{-2}$ ) für die Bindungen ausgedrückt.



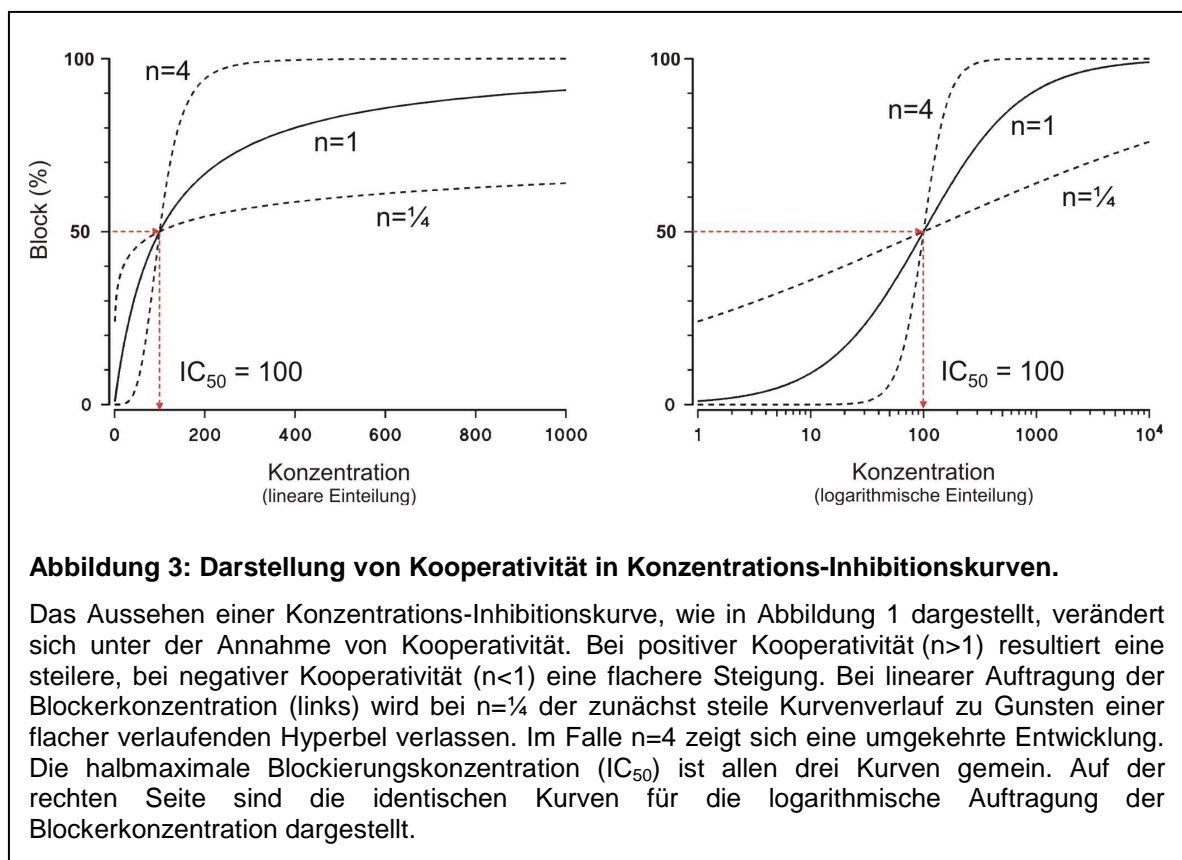
[B]	Konzentration des Blockers [ $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ]
$k_1$	erste Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$k_{-1}$	erste Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion [ $\text{s}^{-1}$ ]
$k_2$	zweite Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion [ $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ]
$k_{-2}$	zweite Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion [ $\text{s}^{-1}$ ]

Der fraktionale Block unter der Annahme von Kooperativität lässt sich durch Gleichung B berechnen. In dieser Gleichung wird der Exponent n angeführt, welcher in Gleichung A gleich eins gesetzt wurde. Dieser wird als Hill-Koeffizient (n) bezeichnet und ist kein Maß für die Anzahl der Bindungsstellen oder an der Bindung beteiligten Untereinheiten; er ist vielmehr Ausdruck für die Stärke der Kooperativität der Bindungsstellen untereinander (Weiss J. N., 1997).

Gleichung B:

$$f_B = \frac{[B]^n}{[B]^n + K_D^n}$$

Die veränderte Affinität des Blockers stellt sich bei positiver Kooperativität ( $n > 1$ ) als steilere Kurve dar. Ist die Kooperativität negativ ( $n < 1$ ) verläuft die Kurve flacher als eine Konzentrations-Inhibitionskurve ohne Kooperativität (s. Abbildung 3).

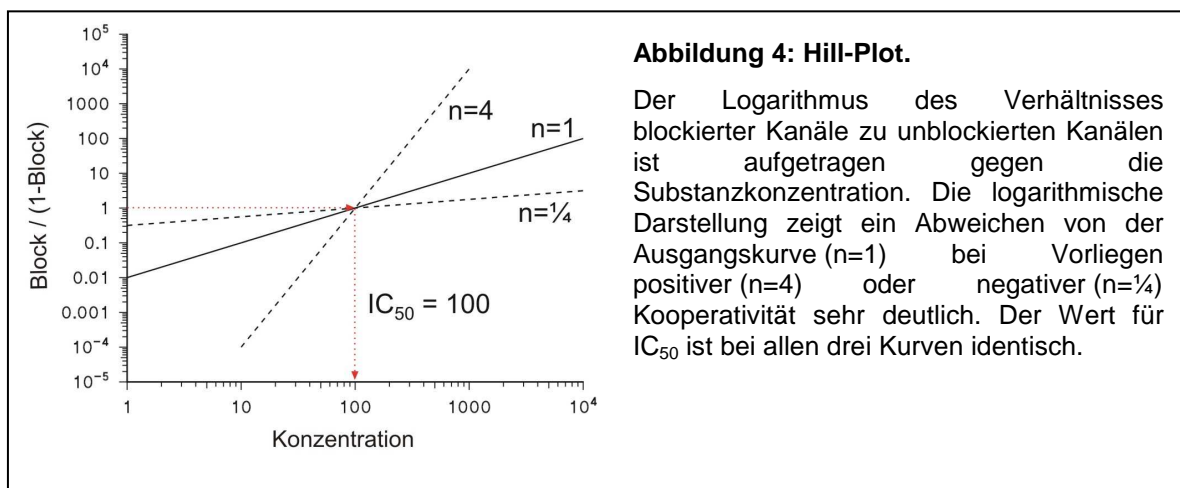


## 1.6 Linearisierungsverfahren

Vor der Ära der elektronischen Datenverarbeitung und Auswertung erfolgte die Parameteranpassung grafisch durch Bestimmung der Steigung und der Achsenschnittpunkte der erstellten Konzentrations-Inhibitionskurven. Da die Steigung einer Kurve und die näherungsweisen Achsenschnittpunkte einer Asymptote nur schwer zu bestimmen sind, wurden Linearisierungsverfahren entwickelt. Heute dienen diese noch zur optischen Verdeutlichung, da Abweichungen von einer Geraden besser zu erkennen sind als von einer Kurve. Zu den Linearisierungsverfahren zählen der Hill-Plot, der Lineweaver-Burk-Plot und der Scatchard-Plot, die im Folgenden beispielhaft dargestellt sind (Bisswanger H., 2000).

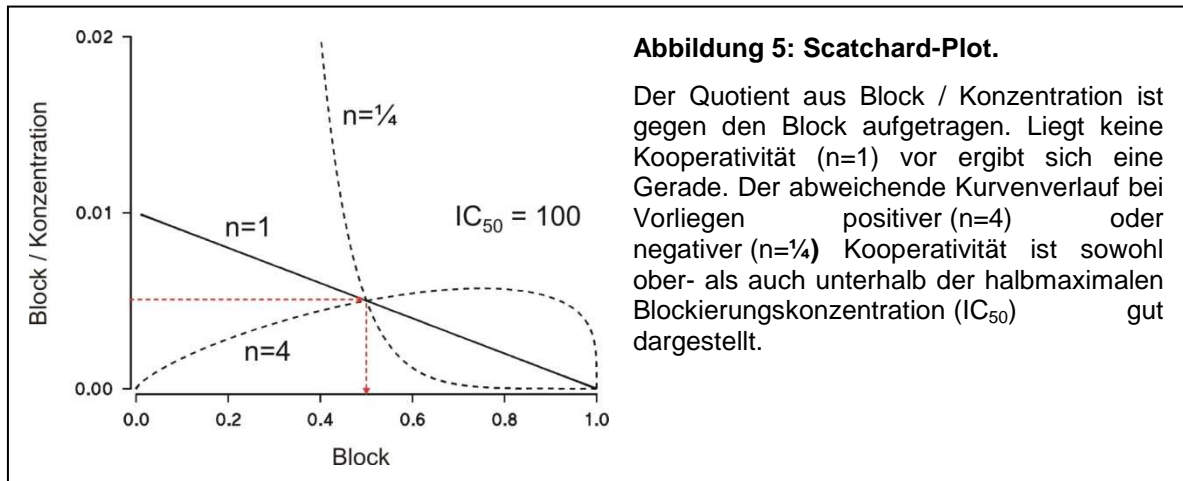
### Hill-Plot:

Bei der Darstellung nach Archibald Vivian Hill wird der Logarithmus des Verhältnisses blockierter Kanäle zu unblockierten Kanälen gegen die Konzentration aufgetragen. Bei unabhängiger Bindung resultiert eine Gerade mit der Steigung eins, bei positiver Kooperativität ist die Steigung größer als eins, bei negativer kleiner als eins.



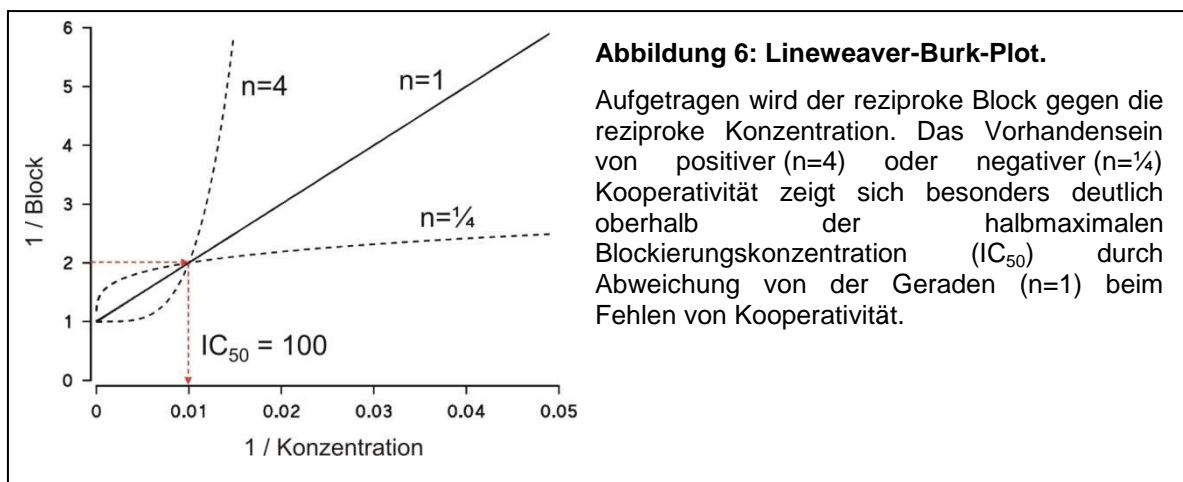
### Scatchard-Plot:

Beim Diagramm nach George Scatchard wird der Quotient aus Block und Konzentration gegen den Block aufgetragen. Das Resultat ist eine Gerade beim Fehlen von Kooperativität, ein konkaver Verlauf bei negativer und eine nach unten geöffnete Parabel bei positiver Kooperativität.



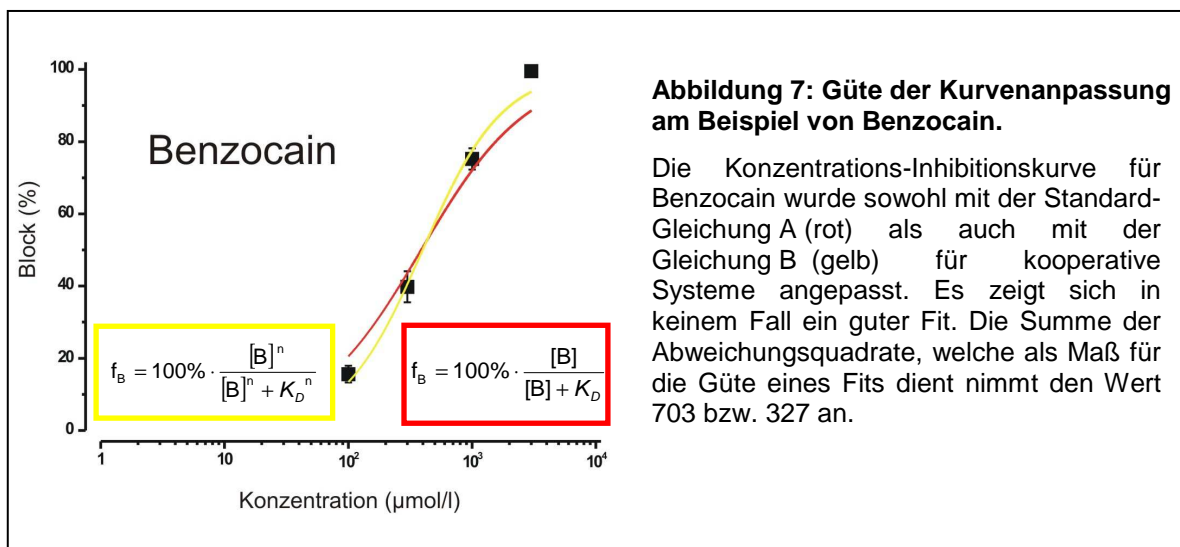
### Lineweaver-Burk-Plot:

Die doppelt reziproke Auftragung nach Hans Lineweaver und Dean Burk zeigt eine positive bzw. negative Kooperativität deutlich als Abweichung von einer Geraden. Durch die Art der Darstellung wirkt sich ein kleiner Messfehler des Blocks vor allem bei kleinen Konzentrationen gravierend aus.



## 1.7 Problembeschreibung

Natriumkanal-blockierende Substanzen, die eine niedrige Potenz haben, weisen oft eine steilere Konzentrations-Inhibitionskurve auf als Substanzen mit höherer Potenz. Werden diese steileren Konzentrations-Inhibitionskurven am Natriumkanal mit der Hill-Funktion angepasst, die eine mögliche Kooperativität verschiedener Bindungsstellen berücksichtigt, so erhält man eine deutlich bessere Anpassung (Fit) als mit dem einfacheren 1:1-Modell (s. Abbildung 7). Allerdings sind auch hier noch gewisse Abweichungen der gefitteten Kurve von den Datenpunkten zu beobachten. Vor allem im höheren Konzentrationsbereich machen sich diese so bemerkbar, dass die Datenpunkte einen stärkeren Block anzeigen, als von der theoretischen Kurve beschrieben. Da dieser Effekt systematisch bei den meisten wenig potenten Natriumkanalblockern auftritt, die eine größere Steigung in der Konzentrations-Inhibitionskurve aufweisen, muss über ein besseres Modell zur Anpassung dieser Kurven nachgedacht werden.



### **1.8 Fragestellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es eine simple Modellvorstellung der Natriumkanalblockade zu finden, die eine deutlich verbesserte Kurvenanpassung der Konzentrations-Inhibitionskurven niedrig potenter Blocker liefert und so die molekulare Interaktion zwischen Blockermolekül und Natriumkanal besser erklären kann.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Arbeitstechnik und Substanzen**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten aus meinen eigenen sowie bereits publizierten Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am Physiologischen Institut des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen, verwendet (Bräu M. E., 1998; Dreimann M., 2001; Häfner S., 2003; Kerkmann H., 2005; Pullmann M., 2003; Schorer E. L., 2004). Bei diesen Arbeiten handelt es sich um elektrophysiologische Untersuchungen der Wirkung Natriumkanal-blockierender Substanzen. Mit Hilfe der „Patch-Clamp“-Technik wurden die Natriumströme und deren Blockierung von Spinalganglienzellen der erwachsenen Ratte registriert. Im Einzelnen handelt es sich um die Konzentrations-Inhibitionsexperimente der in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen, welche in der Zeit von 1997 bis 2000 durchgeführt wurden.

#### **2.1.1 Die Präparation**

Für die Isolierung der Spinalganglienzellen wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts im Alter von 6-8 Wochen mit einem Gewicht zwischen 200 g und 350 g verwendet. Die Ratten wurden durch Kommotion und nachfolgende zervikale Dislokation getötet. Das Töten der Ratten zur Ganglienentnahme wurde dem zuständigen Regierungspräsidenten gemeldet. Nach Entfernung aller Bauch- und Thoraxeingeweide wurde die Wirbelsäule von ventral freigelegt und der knöcherne Rückenmarkskanal links und rechts eröffnet. Durch mechanischen Zug an den nun freigelegten Hinterwurzeln konnten die Spinalganglien herausgezogen und vom Spinalnerven und der Hinterwurzel abgetrennt werden. Die weitere Präparation der Spinalganglien erfolgte in Tyrodelösung. Nach Entfernung des umgebenden Bindegewebes wurden die Ganglien in einer  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freien Tyrodelösung mit 3 mg/ml Kollagenase (Worthington Typ CLS-II, 280 U/l, Biochrom, Berlin) und 1 mg/ml Trypsin Typ-III-S (Sigma, Deisenhofen) für 30 min bei 37°C inkubiert und danach dreimal mit Nährmedium gewaschen.

Anschließend wurden die Ganglien für 5 Minuten in Nährmedium mit Trypsin-Inhibitor Typ II-S (100µg/ml, Sigma, Deisenhofen) und Desoxyribonuclease II (80µg/ml, Fluka, Buchs, Schweiz) inkubiert.

Durch mehrmaliges Durchsaugen durch Pipettenspitzen mit kleiner werdendem Durchmesser wurden die Ganglien in eine Zellsuspension verwandelt. Durch Zentrifugieren setzten sich die Zellen am Boden eines Eppendorf-Gefäßes ab, wurden nach Abpipettieren des Überstandes in Tyrodelösung suspendiert und auf Nährmedium enthaltende Plastikpetrischalen (Ø35mm) verteilt. Unter Carbogen-Begasung (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) wurden die Zellen bis zu 72 Stunden bei 24°C aufbewahrt.

### **2.1.2 Pipetten**

Die Patchpipetten wurden aus Borosilikatglas-Kapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm und einer Wandstärke von 0,32 mm (CEEBEE 101-PS, Chr. Bardram, Svendborg, Dänemark) mittels eines Horizontal-Pipettenziehgerätes (Brown-Flaming Micropipette Puller Model P-97, Sutter Instrument Company, USA) hergestellt. Mit einer feinen Stahl- oder Kunststoffkanüle wurden die Pipetten von hinten mit Intrazellulärlösung gefüllt. Der elektrische Widerstand der Pipetten lag bei 1 - 2 MΩ. Die Annäherung der Pipettenspitze an die Zelle erfolgte unter einem invertierenden Mikroskop (Modell IM, Zeiss, Oberkochen) mit 400-facher Vergrößerung. Die Bewegung der Pipette erfolgte über einen Micromanipulator HS6/2, der Fa. Maerzhäuser, Wetzlar, der mit einem Joystick in drei Ebenen bewegt werden konnte.

### **2.1.3 Nährmedium**

Das zur Zellaufbewahrung und während der Präparation benötigte Nährmedium wurde vor jeder Präparation neu hergestellt. Es bestand aus 26,1 ml Glutamin-freiem „Minimum Essential Medium Eagle“, 0,6 ml einer 200 mmol/l L-Glutamin Lösung, 3 ml fötalem Kälberserum und 0,3 ml einer Penicillin-Streptomycin Lösung (3000 IE Penicillin; 3 mg Streptomycin). Alle Substanzen, bis auf das fötale Kälberserum, welches von der Fa. Biochrom, Berlin stammte, wurden von Sigma, Deisenhofen, Deutschland bezogen.



### 2.1.4 Kristalline Lösungen

Zur isolierten Darstellung TTX-resistenter Natriumströme in der „whole-cell“-Konfiguration wurden modifizierte Extra- und Intrazellulärlösungen verwendet. Der Extrazellulärlösung wurde zur Blockierung TTX-sensitiver Natriumströme 100 nmol/l TTX (Tetrodotoxin) zugesetzt; spannungsabhängige Kaliumströme wurden durch Zusatz von 10 mmol/l TEA (Tetraethylammoniumchlorid) blockiert. Die Natriumkonzentration betrug nur 35 mmol/l, um den Natriumstrom zu vermindern und damit die „Voltage-Clamp“ Bedingungen zu verbessern. Die dadurch verminderte Osmolarität wurde durch Cholinchlorid ausgeglichen.

**Tabelle 1: Ionenzusammensetzung der verwendeten Extrazellulärlösungen.**

Konzentrationsangaben in mmol/l. Der pH wurde in allen Extrazellulärlösungen mit TRIS (Tris[hydroxymethyl]aminomethan) auf 7,4 eingestellt. HEPES (4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazinethansulfonsäure), TEA (Tetraethylammonium), TTX (Tetrodotoxin).

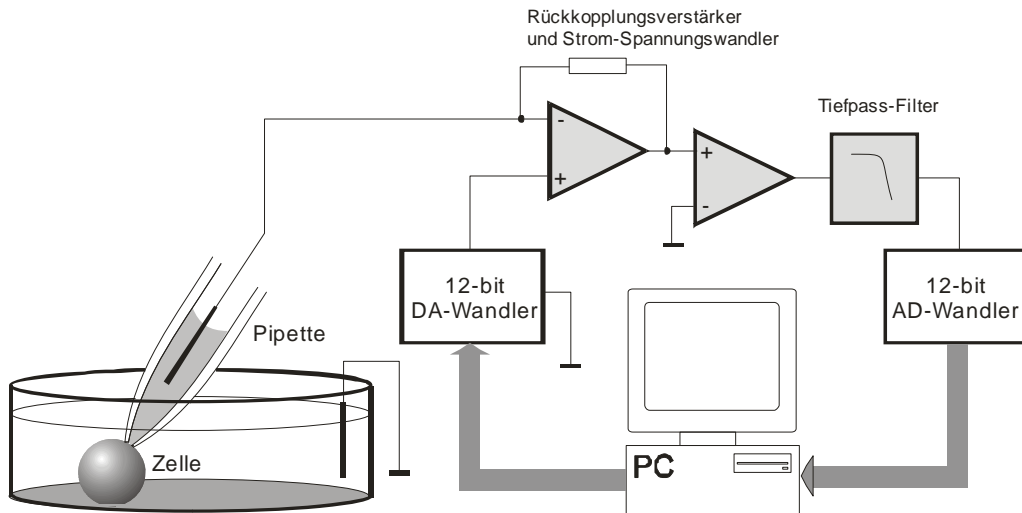
Ion	Tyrode	Tyrode- Ca <sup>2+</sup> ,Mg <sup>2+</sup> frei	35- Tyrode- TTX
Na <sup>+</sup>	145	145	35
Cholin <sup>+</sup>			110
K <sup>+</sup>	5	5	5
Ca <sup>2+</sup>	1		1
Mg <sup>2+</sup>	1		1
Cl <sup>-</sup>	154	150	164
Glucose	6	6	6
HEPES	10	10	10
TEA <sup>+</sup>			10
TTX			0,0001

Als Intrazellulärlösung wurde eine Cäsiumfluoridlösung verwendet, wobei die Cs<sup>+</sup>-Ionen Kaliumströme blockierten, die F<sup>-</sup>-Ionen Calciumströme. Die Lösung (CsF<sub>i</sub>) bestand aus 140 mmol/l CsF, 10 mmol/l NaCl, 3 mmol/l EGTA (Ethylenglycol-Bis[β-Aminoethyl-Ether]-N,N,N',N'-Tetraacetat) und 10 mmol/l HEPES (4-[2-Hydroxyethyl]-1-Piperazin-ethansulfonsäure). Der pH wurde mit TRIS (Tris[hydroxymethyl]aminomethan) auf 7,2 eingestellt. Mit EGTA (Ethylenglycol-Bis[β-Aminoethyl-Ether]-N,N,N',N'-Tetraacetat) wurde die effektive intrazelluläre Calciumkonzentration auf null gesenkt.

### **2.1.5 „Patch-Clamp“-Technik**

Alle Experimente wurden mit der „whole-cell“-Konfiguration der „Patch-Clamp“-Methode durchgeführt. Hierbei wird eine feine Glaspipette mit einem Spitzendurchmesser von etwa 1  $\mu\text{m}$  unter dem Mikroskop auf die Membran einer Zelle aufgesetzt. Mit leichtem Unterdruck wird dann die Zelle an die Pipettenspitze angesaugt, wodurch sich eine elektrisch Isolierende Verbindung zwischen Zellaußenseite und der Glaspipette ergibt. Wird der Unterdruck nun kurzzeitig stark erhöht, kommt es zum Einreißen der Zellmembran innerhalb der Pipettenöffnung, was einen elektrischen Zugang zur Innenseite der Zelle zur Folge hat. Mittels eine „Voltage-Clamp“-Verstärkers (s. Abbildung 8) hat man elektrischen Zugriff zur Innenseite der Zelle und kann den Strom, der durch die Zellmembran fließt, messen.

Der „Patch-Clamp“-Verstärker wird dabei im „Voltage-Clamp“-Modus betrieben, wobei eine bestimmte intrazelluläre Spannung vorgegeben wird und der dafür benötigte Strom gemessen wird. Um Natriumströme darzustellen, wird ein Haltepotential von -90 mV am Verstärker eingestellt. Die TTX-resistenten Natriumströme werden dann nach einem 50 ms langen hyperpolarisierenden Vorimpuls nach -110 mV durch einen 50 ms dauernden depolarisierenden Spannungsimpuls nach -10 mV ausgelöst. Eine Folge von zehn dieser Impulse wird mit einer Frequenz von 2 Hz appliziert und der Strom während jedes Impulses registriert. Der Natriumstrom wird in Kontrolllösung sowie in verschiedenen Lokalanästhetika-Konzentrationen gemessen. Zwischen den einzelnen Konzentrationsschritten wird eine Äquilibrationszeit von mindestens einer Minute abgewartet.



**Abbildung 8. Das „Voltage-Clamp“-Prinzip, dargestellt für einen „Whole-Cell-Patch“.**

Von einem „Personal Computer“ (PC) wird das gewünschte Membranpotential als digitale 12-bit Zahl an einen Digital-Analog-Wandler (DA-Wandler) ausgegeben und in ein analoges Spannungssignal umgewandelt. Diese Spannung wird auf den nicht-invertierenden Eingang eines rauscharmen Operationsverstärkers gegeben und mit der über die Pipette gemessenen intrazellulären Spannung verglichen. Eine vorhandene Spannungsdifferenz wird durch den Operationsverstärker verstärkt, erscheint als Spannung an dessen Ausgang und führt zu einem über den Rückkopplungswiderstand fließenden Strom in die Zelle, bis das durch den DA-Wandler vorgegebene Potential erreicht ist. Der durch die Zelle fließende Strom ist nach dem Ohmschen Gesetz gleich der Spannung am Ausgang des Operationsverstärkers dividiert durch den Rückkopplungswiderstand. Dieses Spannungssignal wird weiter verstärkt; mit einem Tiefpassfilter wird hochfrequentes Rauschen entfernt. Nach Digitalisierung des Signals mit einem 12-bit Analog-Digital-Wandler (AD-Wandler) wird es digital in demselben PC auf Festplatte abgespeichert. (Aus Bräu M. E., 1998)

### 2.1.6 Substanzen

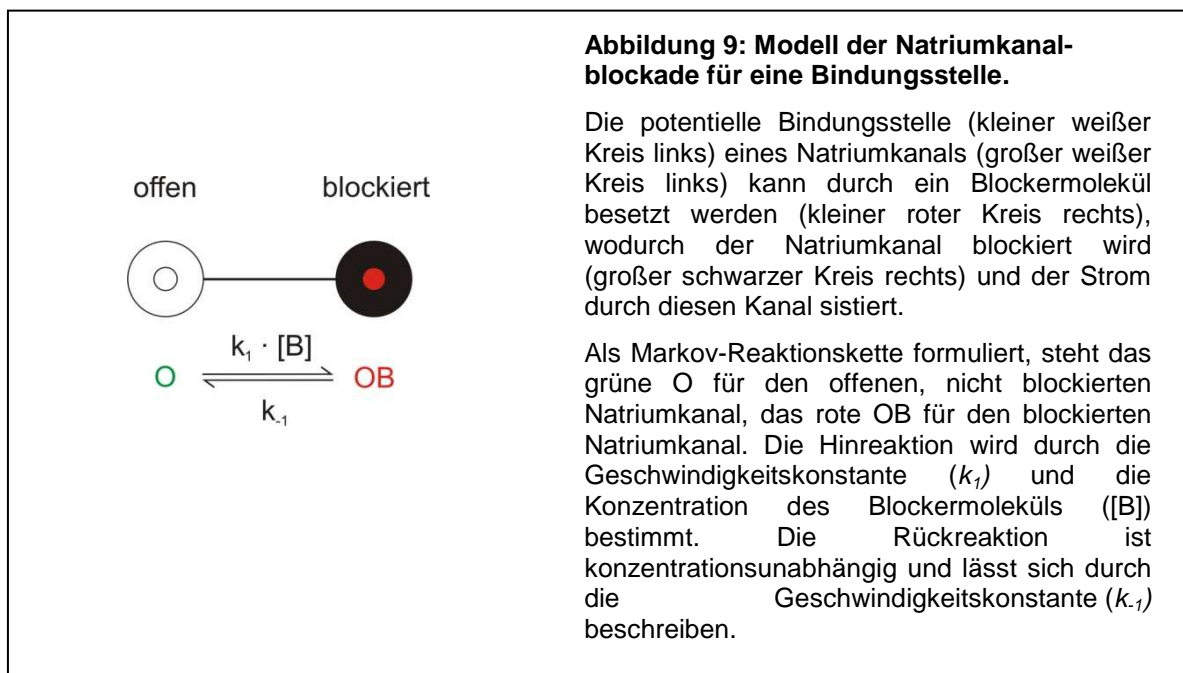
Im Rahmen der Arbeit wurden die Konzentrations-Inhibitionskurven der 21 folgenden Substanzen näher untersucht. Die Bezugswege finden sich in Tabelle 2, die Strukturformeln und die physikalischen Parameter im Anhang.

**Tabelle 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Substanzen und deren Bezugswege.**

<b>Substanz</b>	<b>Herkunft</b>
Amitriptylin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anilin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Benzocain	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Butamben	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Diphenylhydramin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dyclonin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethylbenzylamin	Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland
Etidocain	Astra-Chemicals, Wedel, Deutschland
Lidocain	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Meperidin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Mepivacain	Astra Pain Control, Södertälje, Schweden
Methylbenzylamin	Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland
Mexiletin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Octanol	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Oxybuprocain	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Phenylbutylamin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Phenylethylamin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Phenylethyldiamin	Merck-Schuchard, Hohenbrunn, Deutschland
Phenylmethylamin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Phenylpropylamin	Fluka-Chemie AG, Buchs, Schweiz
Procain	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

## 2.2 Modelle der Natriumstromblockade

Eine schematische Darstellung der Natriumkanalblockade mit einer 1:1 Stöchiometrie zeigt Abbildung 9. Der nicht blockierte Natriumkanal (großer weißer Kreis, links) liegt geöffnet vor. Durch das Binden des Blockermoleküls (kleiner roter Kreis, rechts) kommt es zum Verschluss des Natriumkanals (schwarzer Kreis, rechts). Die unterhalb abgebildete Markov-Reaktionskette beschreibt diesen Vorgang mit den zugehörigen Faktoren Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion ( $k_1$ ), Konzentration des Blockers ( $[B]$ ) und Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion ( $k_{-1}$ ).

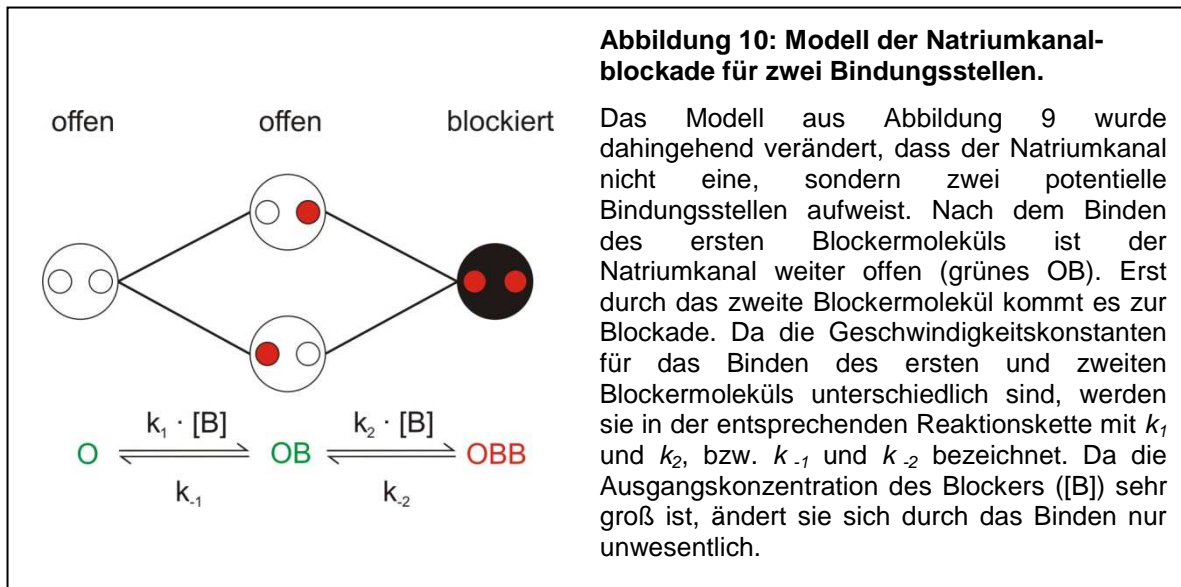


Für diese Annahme lässt sich die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) durch die in der Einleitung beschriebene Gleichung A berechnen.

**Gleichung A:** 
$$f_B = \frac{[B]}{[B] + K_D} \quad \text{entspricht} \quad f_B = \frac{1}{1 + \frac{K_D}{[B]}}$$

Im Reaktionsgleichgewicht entspricht die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) der halbmaximalen Blockierungskonzentration ( $IC_{50}$ ). Die Grundlagen hierfür wurden ebenfalls in der Einleitung dargelegt.

Geht man jedoch davon aus, dass ein Natriumkanalmolekül nicht nur eine Bindungsstelle für ein Blockermolekül aufweist, sondern zwei, und dass beide Bindungsstellen durch Blockermoleküle besetzt sein müssen damit der Stromfluss unterbunden wird, ergibt sich hieraus das Modell in Abbildung 10.



Da sich die Geschwindigkeitskonstanten des Bindens des ersten und zweiten Blockermoleküls unterscheiden, werden sie als  $k_1$  und  $k_2$  bzw.  $k_{-1}$  und  $k_{-2}$  bezeichnet. Die Berechnung der Gesamtdissoziationskonstante ist mit Hilfe von Gleichung B möglich:

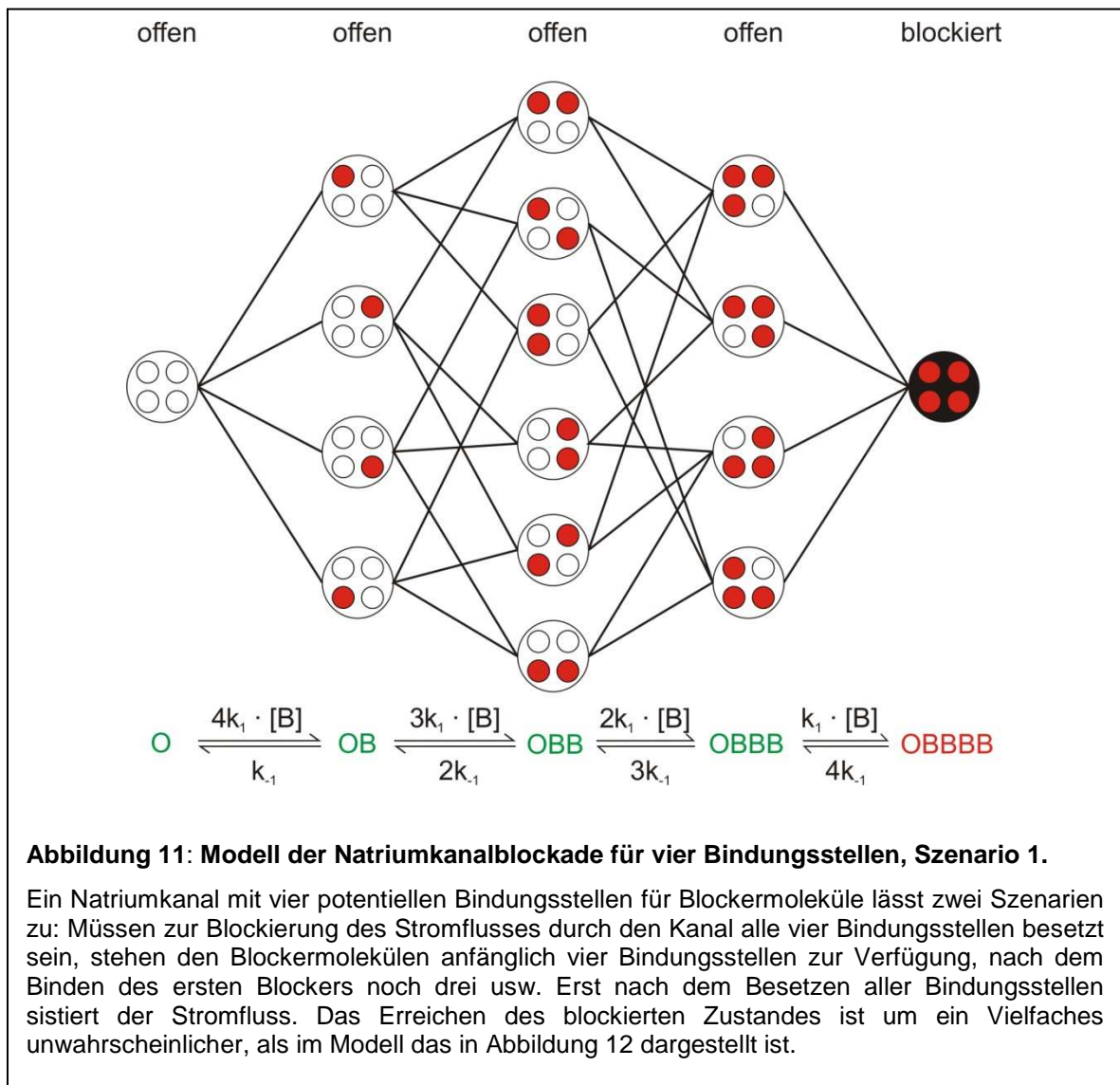
**Gleichung B:** 
$$f_B = \frac{[B]^n}{[B]^n + K_D^n} \quad \text{entspricht} \quad f_B = \frac{1}{1 + \left( \frac{K_D}{[B]} \right)^n}$$

Neben der Kooperativität können noch zwei andere Szenarien angenommen werden, die eine steilere Konzentrations-Inhibitionskurve bedingen. Das kann am Beispiel von vier potentiellen Bindungsstellen im Folgenden dargestellt werden.

Das erste Szenario geht davon aus, dass für die Blockade des Kanals alle vier Bindungsstellen durch Blockermoleküle besetzt sein müssen. Im anderen Szenario reicht bereits das Binden eines Blockermoleküls zur Kanalblockade aus.

Die erste Möglichkeit, bei der alle Bindungsstellen für das Blockieren des Kanals besetzt sein müssen, ist in Abbildung 11 dargestellt. Einem Blockermolekül stehen vier potentielle Bindungsstellen gegenüber. Die Wahrscheinlichkeit einer Bindung

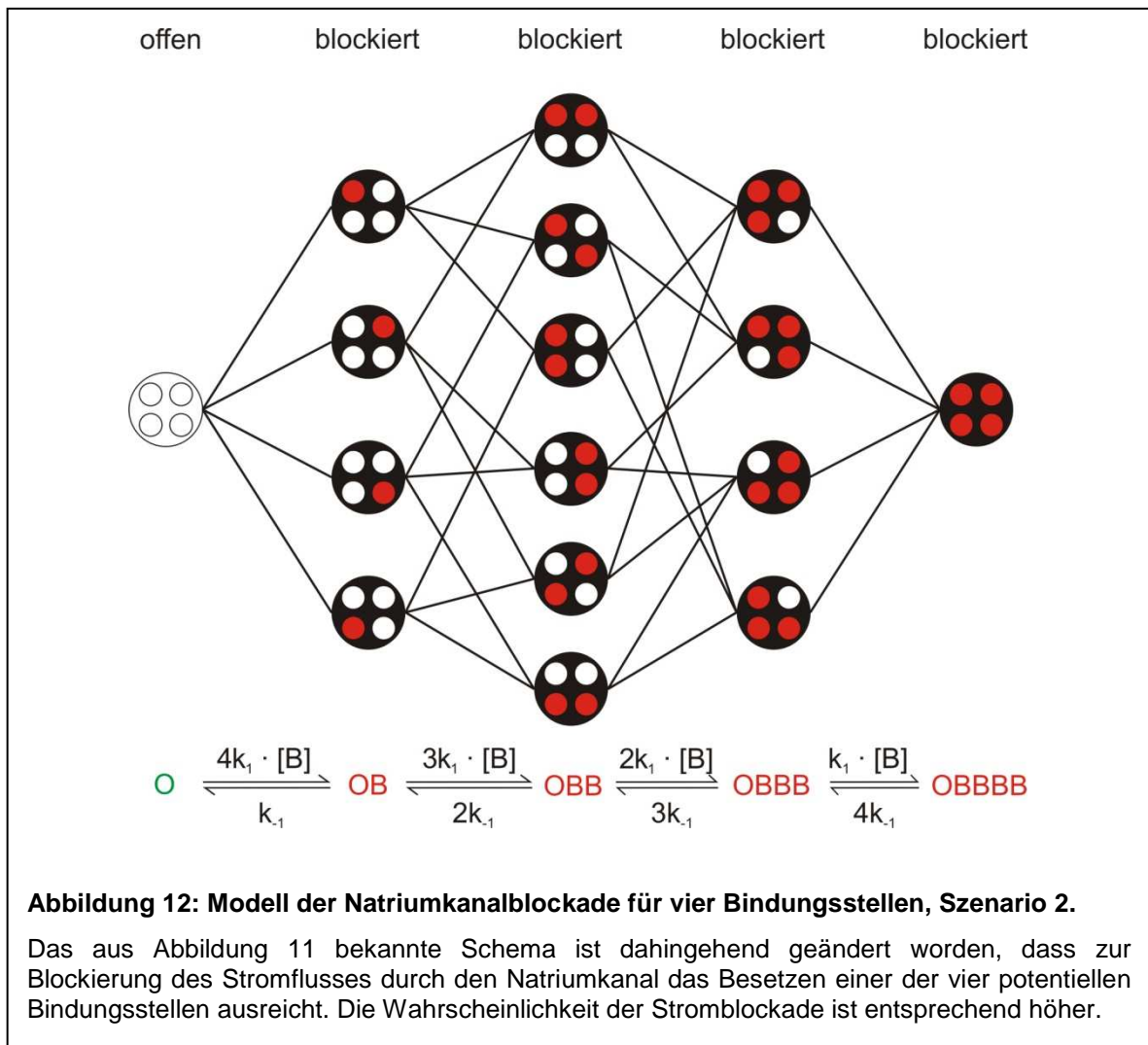
ist damit viermal so hoch wie bei einer möglichen Bindungsstelle. Nach dem Binden des ersten Blockermoleküls stehen noch drei Bindungsstellen zur Verfügung, so dass die Wahrscheinlichkeit auf die dreifache Bindungschance sinkt, danach auf die zweifache und schließlich auf die einfache Wahrscheinlichkeit. Genau reziprok verändern sich die Wahrscheinlichkeiten der Rückreaktionen. Erst nach dem Besetzen aller vier vorhandenen Bindungsstellen ist der Kanal blockiert (schwarzer Kreis, rechts).



Mit Hilfe der Gleichung C lässt sich die Theorie multipler Bindungsstellen, bei der zur Kanalblockierung alle Bindungsstellen besetzt sein müssen (Abbildung 11), berechnen.

Gleichung C:  $f_B = \left( \frac{[B]}{[B] + K_D} \right)^n$  entspricht  $f_B = \frac{1}{\left( 1 + \frac{K_D}{[B]} \right)^n}$

Die zweite mögliche Funktionsweise der Natriumkanalblockade, bei der das Besetzen einer der vier Bindungsstellen ausreicht, um den Stromfluss durch den Kanal zur unterbinden, findet sich in Abbildung 12.



Die Möglichkeiten der Bindung eines Blockermoleküls sind identisch mit denen des Modell aus Abbildung 11. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit der Blockade des Kanals um ein Vielfaches höher, da bereits ein gebundenes Blockermolekül den Kanal verschließt.



Die entsprechende Formel zur Berechnung der Dissoziationskonstanten lautet:

**Gleichung D:**  $f_B = 1 - \left( 1 - \frac{[B]}{[B] + K_D} \right)^n$  entspricht  $f_B = 1 - \left( 1 - \frac{1}{1 + \frac{K_D}{[B]}} \right)^n$

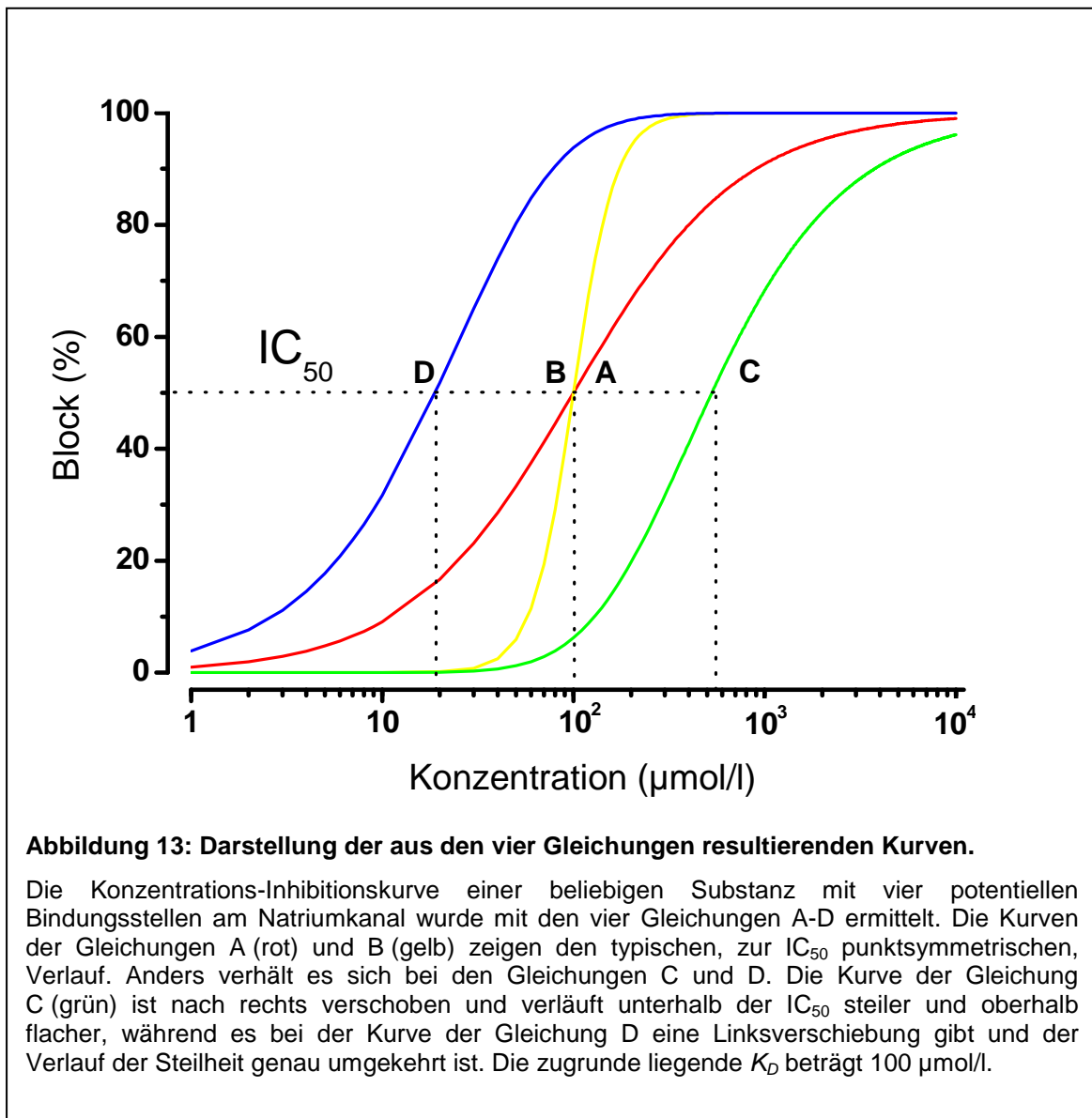
Zur besseren Übersicht sind die ermittelten Gleichungen in der Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3:** Formeln zur Berechnung der Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ), wie im Text beschrieben. Für die graphische Darstellung in Prozent (%) erfolgt die Multiplikation mit 100%.

Gleichung	
<b>A:</b>	$f_B = 100\% \cdot \frac{[B]}{[B] + K_D}$
<b>B:</b>	$f_B = 100\% \cdot \frac{[B]^n}{[B]^n + K_D^n}$
<b>C:</b>	$f_B = 100\% \cdot \left( \frac{[B]}{[B] + K_D} \right)^n$
<b>D:</b>	$f_B = 100\% \cdot 1 - \left( 1 - \frac{[B]}{[B] + K_D} \right)^n$

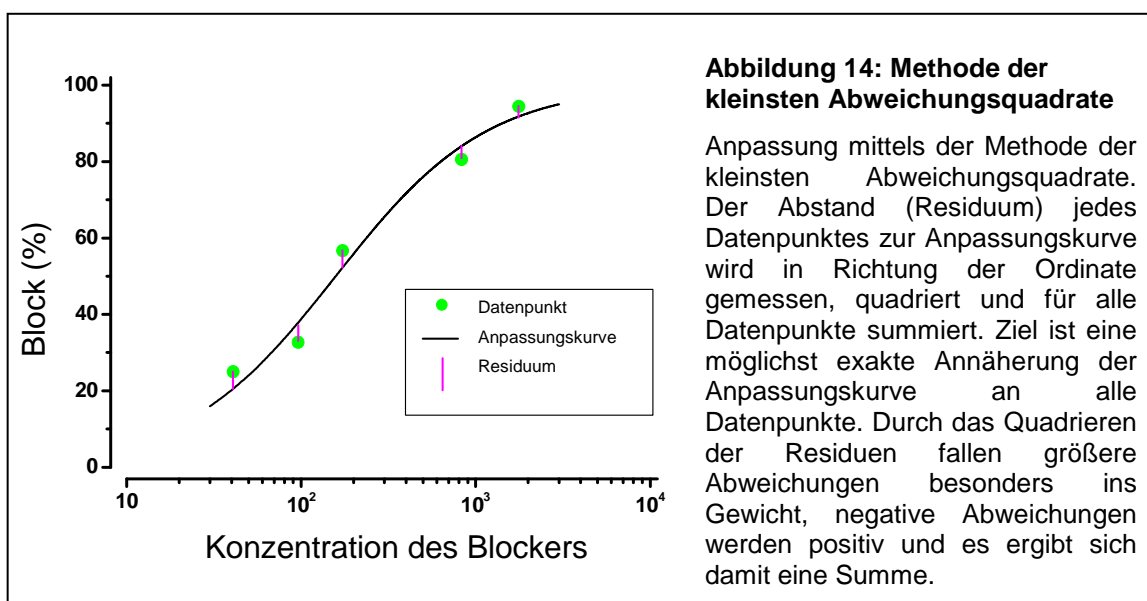
Durch Einsetzen von 100  $\mu\text{mol/l}$  für  $K_D$  in den vier Formeln ergeben sich vier Konzentrations-Inhibitionskurven mit jeweils spezifischem Kurvenverlauf (s. Abbildung 13). Die Kurve der Gleichung A zeigt den aus vielen Veröffentlichungen bekannten typisch zur Dissoziationskonstanten  $K_D$  punktsymmetrischen Verlauf. Bei Anwendung von Gleichung B resultiert eine ebenfalls zur Dissoziationskonstanten  $K_D$  punktsymmetrische Kurve. Allerdings ist die Steigung der Kurve deutlich steiler, bei Annahme von positiver Kooperativität.

Gänzlich anders stellen sich die Kurvenverläufe der Gleichungen C und D dar. Die Kurve C ist gegenüber den Kurven A und B nach rechts verschoben, was einen deutlich höheren Wert für die  $IC_{50}$  bedeutet. Weiterhin ist der Verlauf unterhalb der  $IC_{50}$  steiler und oberhalb flacher als bei Kurve A. Die Kurve D hingegen ist gegenüber der Kurve A nach links verschoben, somit ist die  $IC_{50}$  kleiner. Die Steilheit der Kurve ist unterhalb der  $IC_{50}$  flacher und oberhalb steiler als bei Kurve A, also umgekehrt zur Kurve C.



Um herauszufinden, welches Modell am besten die Interaktion zwischen Natriumkanalblocker und Natriumkanal beschreibt, werden die Parameter der Gleichungen A, B, C und D gemäß der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate – „non linear least square fit (NLLSF)“ an die Datenpunkte der Konzentrations-Inhibitionskurven angepasst. Das praktische Vorgehen hierbei ist das Folgende:

Die experimentell ermittelten Datenpunkte der Konzentrations-Inhibitionsmessungen werden an einem PC in das Programm Fig.P (Fig.P Software Corporation, Durhan, NC, USA, Version 6.0c) geladen. Das Programm erlaubt eine zweidimensionale Darstellung der Datenpunkte, wobei die Konzentration des Blockers als unabhängige Variable auf der X-Achse und die abhängige Variable des anteiligen Blocks des Natriumstromes auf der Y-Achse aufgetragen werden. Mittels PC und entsprechender Software werden die Parameter der vier Gleichungen an die Datenpunkte der Konzentrations-Inhibitionskurven angepasst. Dies geschieht nach der Methode des „NLLSF“: Der Abstand zwischen dem Datenpunkt und der Anpassungskurve wird in Richtung der Ordinate (Y-Achse) gemessen, quadriert und von allen Punkten summiert. Der beste Fit ist derjenige mit der kleinsten Summe der Abweichungsquadrate – „sum of squares (SS)“ (s. Abbildung 14).



Die Parameter der Gleichungen A, B, C und D werden durch die Methode des „NLLSF“ bestimmt. Es handelt sich um:

- die Anzahl der Bindungsstellen ( $n$ ),
- die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ),
- die Summe der Abweichungsquadrate – „sum of squares (SS)“,
- die Standardfehler von  $n$  und  $K_D$ .

### 3 Ergebnisse

Die im Methodenteil dargestellten Blockierungsmodelle für den spannungsabhängigen Natriumkanal wurden an 21 Substanzen und ihren Konzentrations-Inhibitionskurven untersucht. Das genaue Vorgehen hierbei ist ebenfalls im Methodenteil dargestellt. Durch das Anpassen der Parameter jeder der vier Gleichungen ist es möglich eine Kurvenanpassung zu erreichen, wobei für diese Untersuchung die unterschiedliche Güte der Anpassung mit Hilfe der vier Gleichungen entscheidend ist. In Abbildung 15 sind exemplarisch die Konzentrations-Inhibitionskurven von Procain, Phenylpropylamin und Benzocain dargestellt, die sich in ihrer Steilheit deutlich unterscheiden. Die jeweils vier Kurven, welche sich aus den vier Gleichungen A-D ergeben sind farbig unterschieden. Das einfachste, häufig angewandte und mit Gleichung A beschriebene 1:1 Modell, entspricht der roten Kurve. Diese zeigt bei Phenylpropylamin und Benzocain einen deutlich flacheren Verlauf als eine theoretische, ideale Kurve, die exakt durch alle Datenpunkte laufen würde.

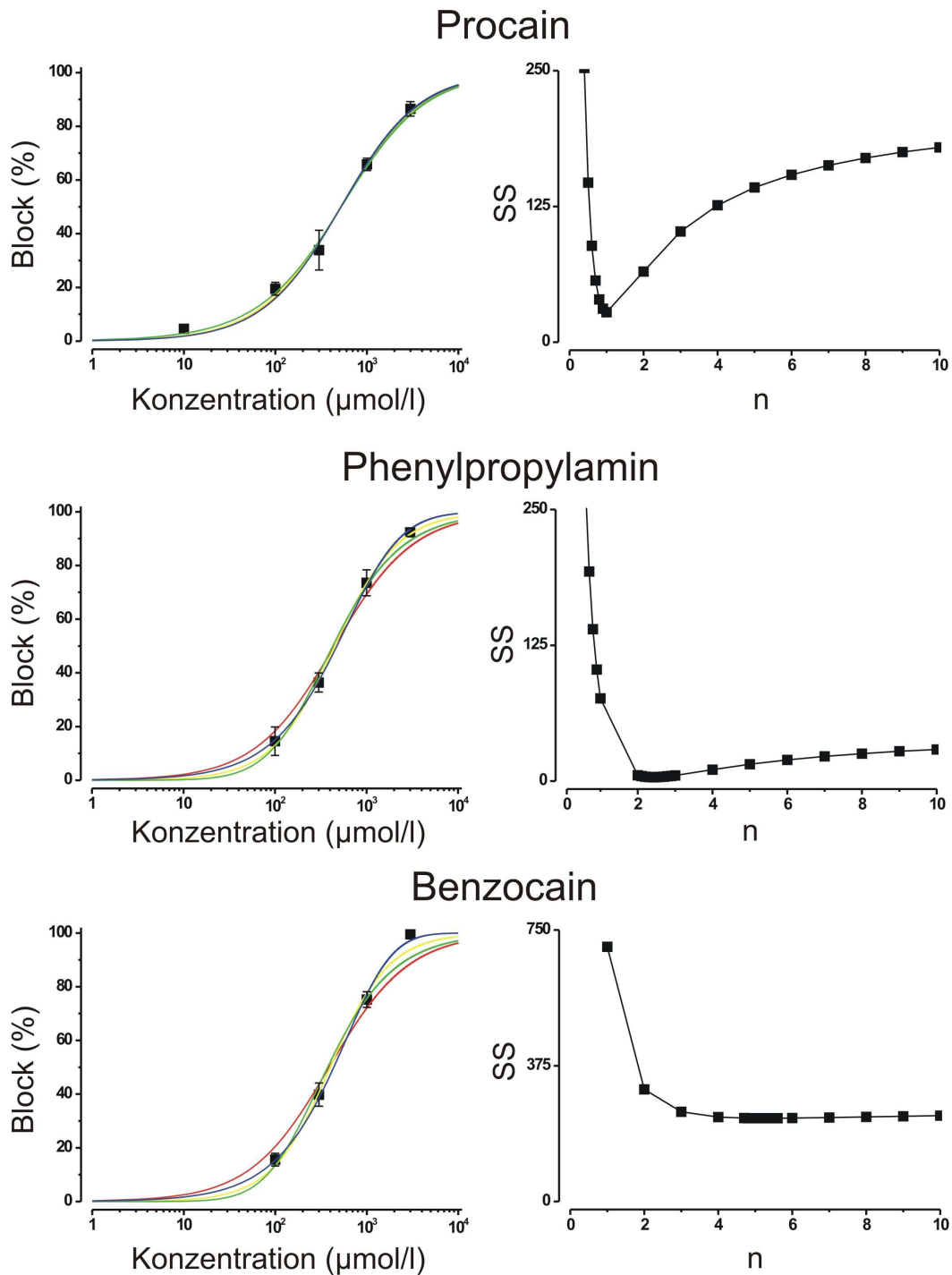
Gleichung B ist gelb dargestellt und spiegelt den Kurvenverlauf unter der Annahme von Kooperativität wider. Der Abstand der Kurve von einer theoretischen Idealkurve ist bereits geringer. In den meisten Fällen ist eine noch bessere Annäherung an die gedachte Idealkurve in den folgenden Kurven C (grün) und D (blau) festzustellen.

Im Anhang sind die Konzentrations-Inhibitionskurven aller 21 untersuchten Substanzen abgebildet. Ebenfalls im Anhang sind die biophysikalischen Parameter der untersuchten Substanzen aufgeführt. Die halbmaximale Blockierungskonzentration ( $IC_{50}$ ) für den tonischen und für den phasischen Block sowie das Verhältnis zueinander sind dargestellt. Die durch die Anpassung ermittelten Parameter der Gleichungen sowie die Summe der kleinsten Abweichungsquadrate sind in Tabelle 5 aufgeführt.

In den meisten Fällen findet sich die beste Anpassung mit Gleichung D, welche davon ausgeht, dass der Natriumkanal mehrere potentielle Bindungsstellen aufweist und das Besetzen einer Bindungsstelle zur Blockade des Stromflusses durch diesen Kanal ausreicht. Es lässt sich nicht bei allen untersuchten

Substanzen eine deutliche Verbesserung der Kurvenanpassung durch Anwendung der Gleichungen C und D erreichen, worauf in der Diskussion genauer eingegangen wird.

Da sich in den Gleichungen C und D im Parameter  $n$  die Anzahl der potentiellen Bindungsstellen wiederfindet, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob sich ein eindeutiges Minimum der Abweichungsquadrate für die Anzahl der Bindungsstellen ( $n$ ) finden lässt. Hierzu wurde während der Anpassung  $n$  auf verschiedene Werte fixiert und jeweils die Summe der Abweichungsquadrate („SS“) bestimmt. Anschließend wurde der Parameter  $n$  aus Gleichung D gegen „SS“ aufgetragen. Nur für einen Teil der untersuchten Substanzen ergibt sich ein eindeutiges Minimum für den Parameter  $n$ .



**Abbildung 15: Beispiele für Konzentrations-Inhibitionskurven und die Summe der Abweichungsquadrate in Abhängigkeit der Zahl der Bindungsstellen (n) in Gleichung D.**

In der linken Hälfte der Abbildung finden sich die Konzentrations-Inhibitionskurven der Substanzen Procain, Phenylpropylamin und Benzocain. Die Datenpunkte und die vier Anpassungskurven der Gleichungen A (rot), B (gelb), C (grün) und D (blau) sind dargestellt. Im Fall von Procain zeigt sich kein deutlicher Unterschied zwischen den vier Kurven. Bei Phenylpropylamin und besonders bei Benzocain findet sich eine augenscheinlich bessere Anpassung der blauen Kurve (Gleichung D) an die Datenpunkte. Rechts neben der jeweiligen Konzentrations-Inhibitionskurve ist die Summe der Abweichungsquadrate („SS“) gegen die Anzahl der Bindungsstellen (n) für die Anpassung der Gleichung D (blaue Kurve) aufgetragen. Procain zeigt ein Minimum bei etwa eins, Phenylpropylamin zwischen zwei und drei. Für Benzocain lässt sich kein scharfes Minimum nachweisen, es liegt aber höher als drei.

Die Substanzen sind nach dem Parameter n aus Gleichung D in Tabelle 4 geordnet:

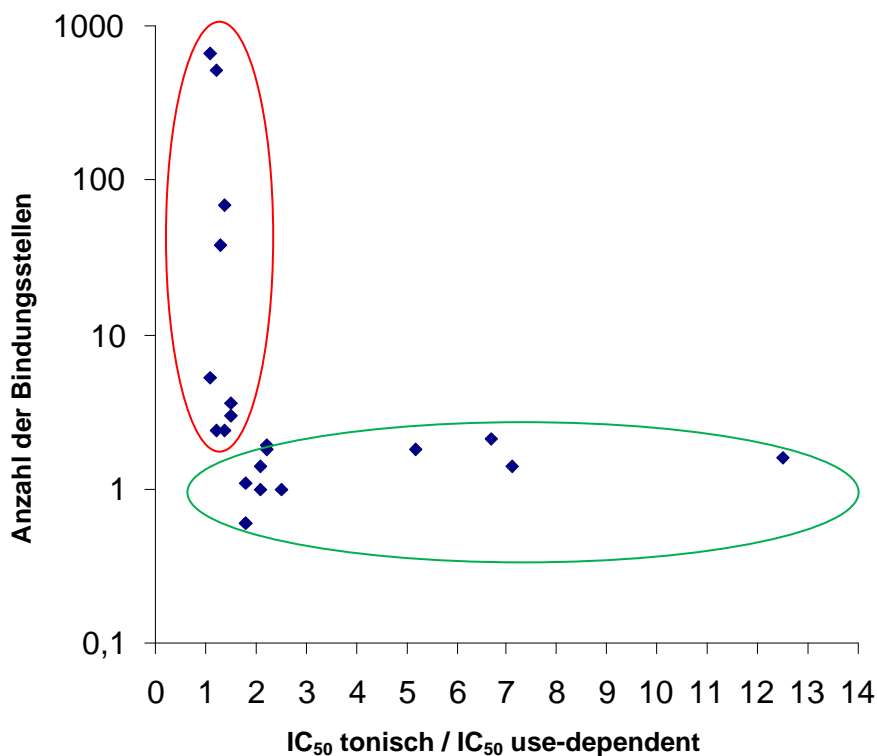
**Tabelle 4: Einteilung der Substanzen nach der Zahl der potentiellen Bindungsstellen.**

Die untersuchten Substanzen wurden nach der Anzahl der errechneten Bindungsstellen (n) aus Gleichung D geordnet. Für den Großteil der Substanzen ergibt sich für n ein Wert zwischen eins und drei. In zwei Fällen nimmt n einen Wert unter eins an, bei sieben Substanzen liegt n über drei, mit einem Maximum von 672 für Octanol. Neben dem Wert für n aus Gleichung D, finden sich in der Tabelle der  $pK_S$ -Wert, der als Maß für die Stärke einer Säure gilt und die Differenz zwischen  $pK_S$  und dem während der Untersuchungen konstant gehaltenen pH-Wert von 7,4. Aus diesen Werten lässt sich berechnen, zu welchem Anteil die Substanz in der Lösung bei einem pH von 7,4 ungeladen vorlag (Hilal S. H. *et al.*, 2003). In der letzten Spalte ist die experimentell ermittelte halbmaximale Blockierungskonzentration ( $IC_{50}$ ) für den tonischen Block in  $\mu\text{mol/l}$  aufgeführt. Eine eindeutige Beziehung zwischen den Werten n (D),  $pK_S$  und  $IC_{50}$ -ton. findet sich nicht.

Substanz	n (D)	$pK_S$	$\Delta pK_S - \text{pH } 7,4$	ungel. (pH 7,4)	$IC_{50}$ ton.
Phenylmethylamin	0,59	9,33	2,09	0,01	3713
Phenylethylamin	0,62	9,96	2,64	0	1897
Mepivacain	1,00	7,70	0,30	0,10	166
Procain	1,10	8,05	0,65	0,04	518
Mexiletin	1,18	9,2	1,80	0,35	258
Oxybuprocain	1,36	8,73	1,33	0,05	10
Lidocain	1,37	8,01	0,46	0,26	158
Dyclonin	1,62	9,13	1,73	0,02	15
Etidocain	1,82	7,74	0,34	0,38	192
Diphenylhydramin	1,84	8,98	1,51	0,03	78
Phenylethyldiamin	1,87	9,50	2,10	0,01	773
Amitriptylin	2,11	9,40	2,17	0,01	18
Methylbenzylamin	2,40	9,54	2,37	0	3069
Phenylpropylamin	2,42	10,16	2,81	0	445
Ethylbenzylamin	3,00	9,64	2,33	0	1991
Phenylbutylamin	3,60	10,36	2,88	0	295
Benzocain	5,26	2,51	-5,23	1	387
Butamben	38,52	2,47	-5,22	1	55
Meperidin	69,80	8,59	1,19	0,09	285
Anilin	510,05	4,60	-2,50	1	3860
Octanol	672,53	-	-	-	426



Bei Betrachtung der Konzentrations-Inhibitionskurven fällt auf, dass vor allem niedrig potente Lokalanästhetika, die einen geringen „use-dependent“ Block aufweisen, eine größere Steigung besitzen. Zur Verdeutlichung wurde die Anzahl der Bindungsstellen ( $n$ ), die sich aus der Anpassung mit Gleichung D ergibt, gegen das Verhältnis von der halbmaximalen Blockierungskonzentration des „use-dependent“ Block zu tonischem Block aufgetragen (s. Abbildung 16). Es ergibt sich, dass eine steilere Konzentrations-Inhibitionskurve mit einer großen Anzahl von Bindungsstellen mit einem sehr geringen bis nicht existentem „use-dependent“ Block einhergeht.



**Abbildung 16: Zahl der Bindungsstellen nach Gleichung D in Abhängigkeit des Verhältnisses von tonischer zu „use-dependent“ Blockade.**

Das Verhältnis von tonischer zu phasischer Blockade des Natriumstromes durch die untersuchten Substanzen ist auf der Abszisse aufgetragen. Die durch Gleichung D für die Substanzen in Form des Parameters  $n$  ermittelte Anzahl der Bindungsstellen findet sich auf der Ordinate.

Wie in Tabelle 5 ersichtlich, weisen hochpotente Substanzen zum Großteil eine deutliche Zunahme des Blockes unter phasischen Bedingungen auf, was einem starken „use-dependent“ Block entspricht.

In dieser Darstellung zeigt sich für die Substanzen, welche eine hohe Anzahl von Bindungsstellen besitzen ein Verhältnis von tonischer zu phasischer Blockade nahe dem Wert eins (Punkte in roter Ellipse). Dies entspricht einem schwachen bis fehlenden „use-dependent“ Block.

Für die Substanzen hingegen, die einen starken „use-dependent“ Block erzeugen, ergibt sich eine geringe Anzahl von Bindungsstellen (Punkte in grüner Ellipse). Diese Beobachtungen stützen unsere Hypothese, dass die Bindung der niedrigpotenten Substanzen sehr viel unspezifischer als bei den hochpotenten Lokalanästhetika erfolgt. Ursächlich sind unterschiedliche zugrunde liegende Blockierungsmechanismen denkbar.

## 4 Diskussion

### 4.1 Der Lokalanästhetikarezeptor am Natriumkanal

Die Interaktion zwischen einem Pharmakon und seinem Rezeptor kann mithilfe des Massenwirkungsgesetzes beschrieben und in eine mathematische Form gebracht werden. Stellt man die Beziehung zwischen der Konzentration des Pharmakons und seiner Wirkung als grafische Funktion dar, so ergibt sich bei logarithmischer Auftragung der Konzentration und linearer Auftragung der Wirkstärke eine sigmoide Kurve. Bei der Interaktion typischer Lokalanästhetika mit ihrem Wirkort, dem spannungsabhängigen Natriumkanal, weist die Konzentrations-Inhibitionsbeziehung auf eine 1:1-Stöchiometrie hin, d. h. ein Lokalanästhetikummolekül blockiert ein Natriumkanalmolekül.

Die Bindungsstelle für Lokalanästhetika am spannungsabhängigen Natriumkanal wurde mithilfe von Punktmutationen identifiziert (Ragsdale D. S. *et al.*, 1994). Die Autoren fanden, dass die für das Binden von Lokalanästhetika-Molekülen entscheidenden Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) in der  $\alpha$ -Helix des Segmentes 6 der Domäne IV des Natriumkanals liegen (*rat brain* IIa,  $\text{Na}_v1.2$ ). Diese beiden Aminosäuren finden sich in allen spannungsabhängigen Natriumkanälen an gleicher funktioneller Stelle (s. Abbildung 17).

<b><math>\text{Na}_v1.2</math></b>	<b>rat brain IIa</b>	...IISFLVVNMYIAV...
<b><math>\text{Na}_v1.5</math></b>	<b>human heart</b>	...IISFLIVVNMYIAI...
	<b>human muscle</b>	...IISFLIVVNMYIAI...
<b><math>\text{Na}_v1.7</math></b>	<b>PN1</b>	...IISFLVVNMYIAV...
<b><math>\text{Na}_v1.8</math></b>	<b>SNS/PN3</b>	...IISFLIVVNMYIAV...
	<b>SNS/PN3 human</b>	...IISFLIVVNMYIAV...
<b><math>\text{Na}_v1.9</math></b>	<b>SNS2/NaN</b>	...IISFLIVVNMYIAV...

**Abbildung 17: Penetranz der klassischen Lokalanästhetikabindungsstelle.**

Ausschnitt der Aminosäuresequenz verschiedener Natriumkanäle um die Lokalanästhetikabindungsstelle im Einbuchstaben-Code. Die Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) (gelb unterlegt), welche die Bindungsstelle für Lokalanästhetika bilden, sind in allen abgebildeten Natriumkanälen an korrespondierenden Stellen vorhanden.

Der Abstand dieser beiden Aminosäuren beträgt in der Aminosäurekette sieben Positionen, was zwei  $\alpha$ -Helix-Windungen entspricht, so dass beide Aminosäuren an derselben Seite des transmembranären Segmentes S6 der Domäne IV zum Porenlumen hin liegen. Innerhalb der Kanalpore liegen die beiden

Aminosäuren ~1,1 nm auseinander. Die funktionell bedeutsamen Molekülabschnitte klassischer Lokalanästhetika-Moleküle weisen einen Abstand von 4 – 5 Atomen auf, was einem Abstand von 1 – 1,5 nm entspricht und somit genau zur Bindungsstelle passt.

Eine andere Arbeit von Yarov-Yarovoy und Mitarbeitern (Yarov-Yarovoy V. *et al.*, 2002) aus dem Jahr 2002 kommt anhand von Untersuchungen am Natriumkanal Na<sub>v</sub>1.2 zu dem Ergebnis, dass die Lokalanästhetika-Bindungsstelle nicht nur auf dem Segment 6 der Domäne IV liegt, sondern zusätzlich auf dem Segment 6 der Domäne III, unterstützt durch das Segment 6 der Domäne I.

Unabhängig von der exakten Lage der beteiligten Aminosäuren bindet das Lokalanästhetikummolekül also gleichzeitig an zwei Aminosäuren des Natriumkanals und geht daher, trotz schwacher Interaktion der einzelnen Bindungen (hydrophobe Wechselwirkungen und Kation- $\pi$ -Interaktion), eine relativ starke Bindung ein (Ragsdale D. S. *et al.*, 1994). Im Vergleich zu hochaffinen Rezeptoren wie z. B. Hormonrezeptoren, deren Dissoziationskonstanten im nanomolaren Bereich liegen, ist die Bindung des Lokalanästhetikums am Natriumkanal jedoch eher schwach ausgeprägt. Die Dissoziationskonstanten typischer Lokalanästhetika liegen im Bereich einiger zehn bis hundert  $\mu\text{mol/l}$ .

Da die Bindungsstelle innerhalb der Pore des Kanals liegt, ist sie funktionell wirksam; der Ionenfluss durch den Kanal wird durch die Anwesenheit des Lokalanästhetikummoleküls in der Pore blockiert. Nicht ganz klar ist, ob es sich hierbei um einen mechanischen Verschluss handelt, wovon die Arbeit von Ragsdale D. S. *et al.*, 1994 ausgeht. In einer neueren Arbeit aus dem Jahr 2005 stellen Lipkind und Fozzard (Lipkind G. M. und Fozzard H. A., 2005) ein modifiziertes Modell über die Natriumkanal-Blockade durch Lokalanästhetika vor. Sie gehen für ionisierbare Moleküle von einer Interaktion zwischen der geladenen Alkylaminogruppe des Lokalanästhetikums und seiner Bindungsstelle in Form von van-der-Waals-Kräften aus. Das Sistieren des Durchstroms von Natriumionen führen sie nicht auf einen mechanischen Verschluss des Kanals zurück, sondern auf eine elektrostatische Barriere, gebildet vom kationischen Lokalanästhetikum. Die positive Ladung des Lokalanästhetikums blockiert hiernach den Durchstrom

der ebenfalls positiv geladenen Natriumionen. Die Funktionsweise des ungeladenen Benzocains erklärten sie wiederum mit einer Stabilisierung des geschlossenen Kanalzustandes.

Beide Theorien gehen davon aus, dass es sich um die Interaktion eines Blockermoleküls mit einem Kanalmolekül handelt. Die sich hieraus ergebende Konzentrations-Inhibitionskurve müsste im Hill-Plot eine Steigung von eins haben. Tatsächlich weisen die meisten Lokalanästhetika für die Natriumkanalblockade auch eine Steigung von eins im Hill-Plot auf, entsprechen also der theoretischen Überlegung.

In der Literatur (Meeder T. und Ulbricht W., 1987) sowie in eigenen Untersuchungen finden sich für bestimmte Lokalanästhetika deutliche Abweichungen von dieser idealen Modellvorstellung; ihre Konzentrations-Wirkungsbeziehungen verlaufen wesentlich steiler. Die größere Steilheit wird dabei oft als gegeben hingenommen, die molekulare Ursache dafür wird nicht genauer untersucht. Interessant hierbei ist das Lokalanästhetikum Benzocain. Es hat eine geringe Potenz, zeigt kaum „use-dependent“ Block und weist in Konzentrations-Inhibitionskurven immer eine Steilheit größer eins auf. In einer Arbeit von Meeder und Ulbricht (Meeder T. und Ulbricht W., 1987) wird die Konzentrations-Inhibitionskurve als Hill-Plot dargestellt. Da in dieser Darstellung die Datenpunkte nicht linear verlaufen, sondern eine nach unten durchgebogene Krümmung aufweisen, wird von den Autoren kurzerhand nur der mittlere Teil der Kurve mit einer Geraden angepasst, die dann eine Steigung von eins aufweist. Die Abweichungen von der Geraden im unteren und oberen Bereich werden von den Autoren als „strange results“ bezeichnet und können von ihnen nicht hinreichend erklärt werden.

Würde man die Datenpunkte mit Gleichung D anpassen würde die Krümmung bei Annahme einer hohen Anzahl von Bindungsstellen berücksichtigt werden und man bekäme eine deutlich bessere Anpassung mit einer plausiblen Erklärung.

Diese Beobachtungen finden sich bei vielen niedrigpotenten Lokalanästhetika und oft auch bei Substanzen, die zwar keine Lokalanästhetika sind, jedoch in hoher Konzentration auch Natriumkanäle blockieren. Gleichzeitig zeigen diese Substanzen oft einen deutlich schwächeren „use-dependent“ Block (s. Abbildung 16).

Substanz	Gleichung A				Gleichung B				Gleichung C				Gleichung D							
	K <sub>D</sub> = IC <sub>50</sub>	SE (K <sub>D</sub> )	SS	K <sub>D</sub> = IC <sub>50</sub>	SE (K <sub>D</sub> )	n	SE (n)	SS	K <sub>D</sub>	SE (K <sub>D</sub> )	IC <sub>50</sub>	n	SE (n)	SS	K <sub>D</sub>	SE (K <sub>D</sub> )	IC <sub>50</sub>	n	SE (n)	SS
Phenylmethylanilin	3713,62	382,50	42,20	3844,97	171,70	0,83	0,04	3,90	7254,85	708,20	4288,24	0,70	0,03	1,70	1663,87	523,00	3723,03	0,59	0,10	11,50
Phenylethylanilin	1897,12	133,00	18,20	1989,77	75,70	0,87	0,03	2,40	2988,75	306,10	1993,27	0,76	0,04	1,70	948,76	271,30	1953,18	0,62	0,10	5,55
Procain	518,28	36,50	27,50	517,57	42,10	0,98	0,08	26,70	668,36	192,20	521,23	0,84	0,15	21,80	554,50	202,70	520,80	1,05	0,30	27,24
Mexiletin	258,02	18,30	538,30	258,20	22,00	1,00	0,09	538,30	278,70	85,80	259,42	0,95	0,17	536,50	320,80	234,20	281,62	1,10	0,68	535,50
Mepivacain	166,13	1,60	0,23	166,60	1,80	1,00	0,01	0,13	158,80	14,40	158,80	1,00	0,07	0,18	174,95	7,20	166,93	1,03	0,03	0,09
Lidocain	157,74	11,50	29,90	159,07	11,40	1,10	0,08	23,30	145,97	56,70	158,13	1,06	0,28	29,50	247,76	64,50	163,17	1,37	0,25	13,49
Dyclonin	14,98	1,60	87,20	15,11	1,70	1,10	0,12	81,10	16,20	7,60	15,08	0,95	0,28	86,50	29,89	14,70	15,96	1,62	0,60	53,03
Etidocain	192,32	10,30	10,50	186,70	4,50	1,10	0,03	1,50	139,03	23,20	185,64	1,24	0,14	3,40	410,38	82,50	190,22	1,82	0,30	0,88
Diphenylhydranilin	78,63	12,90	107,30	81,00	13,80	1,10	0,22	87,80	57,21	68,60	81,23	1,30	1,10	102,10	185,24	176,00	84,75	1,84	1,40	72,04
Phenylethylidiamin	772,94	81,50	45,90	774,12	78,40	1,10	0,10	31,90	629,87	348,90	805,67	1,20	0,04	42,40	1804,24	918,00	809,56	1,87	0,75	16,25
Oxybutprocain	10,33	0,80	53,50	10,29	0,56	1,13	0,06	24,20	5,33	1,30	9,82	1,60	0,30	17,50	15,96	5,00	10,61	1,36	0,31	34,33
Amitriptylin	17,86	1,48	58,25	17,81	0,74	1,19	0,05	14,67	9,98	3,19	17,27	1,52	0,36	30,76	48,25	9,26	18,76	2,11	0,33	5,96
Methylbenzylanilin	3068,52	332,20	47,70	3035,35	207,20	1,20	0,09	15,20	1888,96	984,90	2948,41	1,40	0,50	36,10	9497,02	2361,30	3187,93	2,39	0,50	2,64
Ethylbenzylanilin	1990,85	301,60	95,70	2011,76	258,90	1,20	0,18	56,40	1315,24	1139,40	1960,02	1,35	0,84	82,50	8260,85	6023,60	2147,17	3,00	1,90	20,46
Phenylpropylanilin	441,52	66,20	76,20	449,08	15,00	1,30	0,05	4,00	164,48	104,50	425,30	2,12	1,10	24,00	1425,82	356,40	472,88	2,42	0,49	3,56
Benzocain	387,39	48,20	703,30	398,46	30,10	1,30	0,12	327,20	107,15	95,27	373,78	2,75	2,06	473,10	3094,93	3071,20	435,93	5,26	4,80	229,91
Phenylbutylanilin	295,24	58,10	157,50	302,18	13,40	1,40	6,10	7,90	16,91	47,80	279,47	11,80	31,90	24,00	1519,21	1382,80	322,57	3,60	2,90	26,02
Butamben	55,24	11,10	4913,00	57,20	8,50	1,50	0,29	3928,50	9,96	21,50	54,06	4,10	7,80	4349,00	3385,84	5,84E+04	61,48	38,52	666,10	3887,34
Meperidin	285,93	57,70	418,60	292,84	15,20	1,60	0,14	39,10	1,61	79,70	273,98	118,30	5790,80	181,00	3,20E+04	3,47E+05	318,87	69,80	752,90	31,64
Octanol	426,07	43,00	1,04E+04	454,72	25,30	1,74	0,20	6731,40	13,73	76,30	425,07	21,80	119,00	8189,40	4,84E+05	1,83E+08	461,73	727,20	2,75E+05	6805,27
Anilin	3860,49	1053,80	136,50	2973,50	141,40	1,80	0,19	4,60	9,80	531,30	3000,93	212,60	1,15E+04	13,60	2,44E+06	1,51E+11	3320,88	510,05	3,15E+07	71,91

**Tabelle 5: Ergebnisse der Berechnungen der Gleichungen A, B, C und D**

Diese Tabelle zeigt die ausführlichen Ergebnisse der Berechnungen. Abgebildet sind  $K_D$  die errechnete Dissoziationskonstante der jeweiligen Gleichung (A-D), SE der Standardfehler, n die Anzahl der potentiellen Bindungsstellen, „SS sum of squares“ die Summe der Abweichungsquadrate. Gelb hinterlegt ist das Minimum von „SS“ für jede Substanz.

#### **4.2 Blockierungsmodelle für die steilere Konzentrations-Inhibitionskurve**

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Modellvorstellung der Natriumkanalblockade überprüft, um die deutlich steilere Konzentrations-Wirkungsbeziehung, die wie bereits erwähnt meist bei niedrigpotenten Lokalanästhetika und anderen Natriumkanal-blockierenden Substanzen zu beobachten ist, zu erklären. Die drei Modelle (B – D) haben gemein, dass mehrere Blockermoleküle am Natriumkanal binden.

Das erste Modell baut auf dem Prinzip der Kooperativität auf. Hierbei wird nach Binden des ersten Blockermoleküls, die Bindung weiterer Blockermoleküle begünstigt, d. h. die Affinität für weitere Blockermoleküle ändert sich nach Bindung des ersten Blockermoleküls. Die sich daraus ergebende Konzentrations-Wirkungskurve ist steiler als die Konzentrations-Wirkungskurve bei nur einem Blockermolekül. Die Hill-Gleichung (Gleichung B) mit einem Hill-Koeffizienten größer eins wird hierbei oft benutzt, um die größere Steilheit der Kurve zu beschreiben. Die Kurve ist dabei punktsymmetrisch zur halbmaximalen Blockierungskonzentration.

Die beiden weiteren Modelle beruhen darauf, dass ebenfalls mehrere Blockermoleküle an den Kanal binden. Im Gegensatz zu den Modellen A und B gibt es aber keine Interaktion zwischen den Molekülen am Kanal, es kommt also zu keiner Affinitätsänderung der Bindungsstelle. Jede Bindungsstelle ist dabei unabhängig von anderen Bindungsstellen am Natriumkanal. Die beiden Modelle unterscheiden sich lediglich dadurch, dass bei dem einem Modell alle Bindungsstellen besetzt sein müssen bevor es zu einer Blockade des Kanals kommt (Gleichung C). Bei dem anderen Modell reicht es bereits aus, wenn nur eine von mehreren Bindungsstellen besetzt ist (Gleichung D). Die Steilheit der Konzentrations-Inhibitionskurve ist bei diesen beiden Modellen asymmetrisch zur halbmaximalen Blockierungskonzentration. Bei Gleichung C ist sie im unteren Teil steiler, bei Gleichung D im oberen Teil. Dies bedeutet, dass nur anhand der Form der Konzentrations-Wirkungskurve auf das zugrundeliegende Blockierungsmodell geschlossen werden kann. Weiterhin kann anhand der Steilheit der Kurve die Anzahl der Bindungsstellen bestimmt werden.



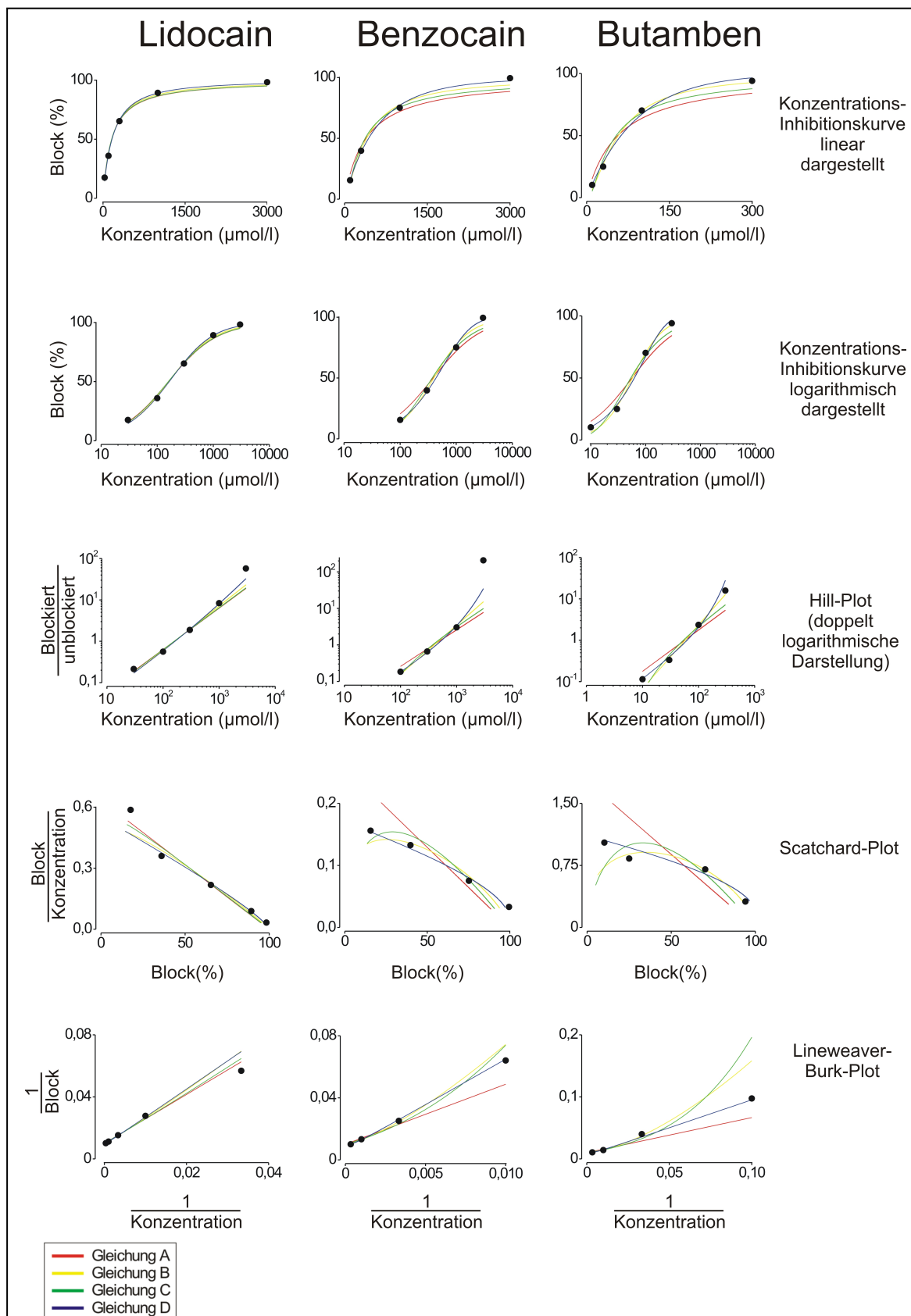
Die Unterschiede in den Konzentrations-Wirkungskurven sind jedoch gering ausgeprägt, so dass sehr genaue oder sehr viele Messungen benötigt werden, um eine statistisch signifikante Aussage treffen zu können. Während die Unterscheidung zwischen den beiden Modellen noch recht gut anhand der unterschiedlichen Asymmetrie der Kurven gelingt, wird die exakte Bestimmung der Zahl der Bindungsstellen mit zunehmender Anzahl deutlich schwieriger bis unmöglich (s. Abbildung 15).

Die einfache Modellvorstellung, dass für die schwach Natriumkanal-blockierenden Substanzen mehrere Bindungsstellen am Natriumkanal existieren, jedoch die Bindung an einer Stelle bereits ausreicht, um den Kanal zu blockieren (Gleichung D) liefert in den meisten Fällen die beste Anpassung an die Datenpunkte. Einschränkend muss jedoch festgestellt werden, dass die Anpassung der anderen Modelle (Gleichung B und C), die ebenfalls zu einer steileren Konzentrations-Inhibitionskurve führen, in vielen Fällen nur geringfügig schlechter ist und sich aufgrund des großen statistischen Fehlers nicht signifikant unterscheidet.

Mehrere Gründe sprechen jedoch für die Annahme von Gleichung D:

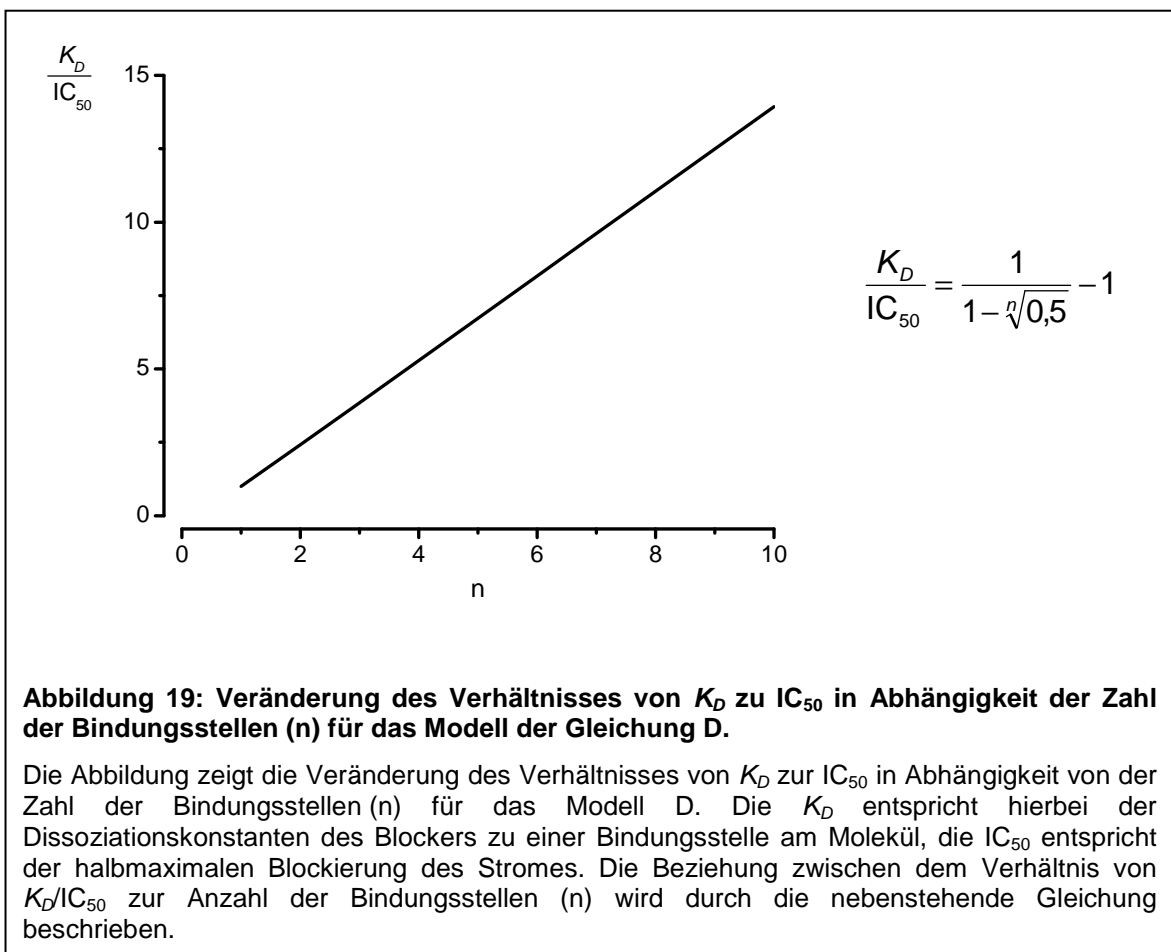
- Die Konzentrations-Inhibitionskurve in Gleichung D ist im Konzentrationsbereich oberhalb des  $IC_{50}$ -Wertes steiler. Dies wird auch in den meisten Daten beobachtet. Bei Gleichung C liegt die größere Steilheit unterhalb der  $IC_{50}$ . Auch bei anderen Darstellungen wie dem Hill-Plot, dem Scatchard-Plot oder dem Lineweaver-Burk-Diagramm werden die Datenpunkte ebenfalls besser mit Gleichung D beschrieben (s. Abbildung 18). Dies schließt auch Daten aus der Literatur mit ein (Meeder T. und Ulbricht W., 1987).
- Die Affinität des Blockers zur einzelnen Bindungsstelle muss in Gleichung D nur sehr gering sein. Je mehr Bindungsstellen für die Blockade vorhanden sind, umso stärker verschiebt sich die  $IC_{50}$  nach links im Verhältnis zur  $K_D$  der einzelnen Bindung (s. Abbildung 19). Da die  $IC_{50}$ -Werte für die schwachen Blocker bereits hoch sind, bedeutet dies, dass die Affinität der einzelnen Bindungsstelle bei hoher Anzahl von

Bindungsstellen noch sehr viel geringer ist und daher auch nicht mehr spezifisch sein muss. Auf molekularer Ebene wäre das damit erklärbar, dass die Substanzen an sehr vielen einzelnen Aminosäuren des Kanalproteins unspezifisch binden, wobei die meisten Bindungen jedoch wahrscheinlich ohne Funktionsbeeinträchtigung des Kanals bleiben. Gibt es jedoch eine größere Anzahl von Aminosäuren innerhalb der Pore die nach Bindung der Substanz eine Blockade zur Folge haben, würde das dem Modell D entsprechen. Bei Gleichung C müsste umgekehrt die Affinität zu jeder einzelnen Bindungsstelle sehr hoch sein. Aus molekularer Sicht ist das eher unwahrscheinlich.



**Abbildung 18: Vergleich der Konzentrations-Inhibitionskurven von Lidocain, Benzocain und Butamben.**

Die zweite Zeile von oben zeigt die Konzentrations-Inhibitionskurven von Lidocain, Benzocain und Butamben. Die Kurven der Gleichungen A-D lassen sich unterschiedlich gut an die Datenpunkte anpassen. Sehr gering sind die Unterschiede bei Lidocain, als klassisches Lokalanästhetikum mit einer errechneten Anzahl von 1,37 Bindungsstellen. Steigt die Anzahl der Bindungsstellen lassen sich die Kurven anhand der Güte ihrer Anpassung deutlich unterscheiden. Für Benzocain errechnen wir mit Gleichung D etwa fünf und für Butamben über 38 Bindungsstellen.



In vielen Publikationen wird zur Anpassung steilerer Konzentrations-Inhibitionskurven Gleichung B verwendet, die auf dem Modell der Kooperativität beruht. Wie jedoch bereits 1997 von Weiss (Weiss J. N., 1997) betont, ist der daraus abgeleitete Hill-Koeffizient kein Maß für die Anzahl der Bindungsstellen oder an der Bindung beteiligten Untereinheiten; er ist vielmehr Ausdruck für die Stärke der Kooperativität der Bindungsstellen untereinander.

In einer Arbeit aus dem Jahr 2002 fordert beispielsweise Mujtaba (Mujtaba M. G. *et al.*, 2002), aufgrund eines Hill-Koeffizienten von zwei, dass für die Blockierung eines Natriumkanals zwei Moleküle Prenylamin erforderlich sind. Alternativ ist eine massive Diskrepanz zwischen verabreichter und effektiver Dosis denkbar. Sie gehen jedoch auf der Basis von Konkurrenzexperimenten von einer Bindung des Prenylamins an anderer Stelle als an der klassischen Lokalanästhetika-Bindungsstelle aus.

In Tabelle 5 zeigt sich für die Gleichung B kein n-Wert über zwei. Unter der Kenntnis der Arbeit von Weiss (Weiss J. N., 1997) ist dies nicht überraschend. Hiernach liegt der Hill-Koeffizient bei neutraler Kooperativität für bis zu zehn Bindungsstellen immer unter zwei.

Auf den Sachverhalt, dass der Hill-Koeffizient in Gleichung B nicht der Anzahl der Bindungsstellen entspricht wird in den meisten Publikationen jedoch meist nicht näher eingegangen, da sich die zu Grunde liegenden molekularen Phänomene mit den gewonnenen Daten nicht erklären lassen.

In Zusammenschau der Literatur und unserer Ergebnisse gehen wir von folgender Vorstellung aus:

1. Normale Lokalanästhetika weisen eine Bindungsstelle am Natriumkanalmolekül auf. Die Affinität des Lokalanästhetikum-Moleküls zu dieser ist hoch.
2. Niedrig potente Natriumkanal-blockierende Substanzen, die sich in ihrer Struktur mehr oder weniger deutlich von den klassischen Lokalanästhetikum-Molekülen unterscheiden, blockieren den spannungsabhängigen Natriumkanal nicht ausschließlich durch Bindung an der klassischen Lokalanästhetika-Bindungsstelle, sondern können auch an anderen Stellen des Natriumkanals binden und blockieren. Im Modell ist die Affinität des Blockermoleküls zum Natriumkanalmolekül deutlich geringer, als es durch die  $IC_{50}$  erscheint. Vielmehr stehen diesen Substanzen mehrere Bindungsstellen niedriger Affinität zur Verfügung, die in ihrer Summe eine ähnliche Affinität, wie hochpotente Lokalanästhetika, die hochaffin an der klassischen Phenylalanin (F) und Tyrosin (Y) Bindungsstelle binden, ergeben.

Hinweise auf einen von der klassischen Lokalanästhetika-Bindungsstelle differenten Ort der Interaktion finden sich in der Literatur für verschiedenste Natriumkanal-blockierende Substanzen. Es handelt sich zum Beispiel um das Opioid Meperidin, welches ohne Besetzen des Opioidrezeptors oder der klassischen Lokalanästhetika-Bindungsstelle spannungsabhängig Natriumkanäle blockiert (Bräu M. E. *et al.*, 2000). Weiterhin hat das potente Opiat Remifentanyl nur eine schwach ausgeprägte Wirkung am Natriumkanal ohne „use-dependent“

Block aber eine steile Konzentrations-Wirkungskurve mit einem Hill-Faktor von 2,4. Diese Wirkung ist nicht über den Lokalanästhetikum-Rezeptor vermittelt (Leffler A. *et al.*, 2012). Das ebenfalls potente Opiat Buprenorphin ruft am Natriumkanal eine gute Blockade mit starkem „use-dependent“ Block hervor. Dieser Effekt wird über den Lokalanästhetikarezeptor vermittelt. Die Konzentrations-Wirkungskurve hatte eine normale Steigung mit einem Hill-Faktor unter eins (Leffler A. *et al.*, 2012). A-803467, ein sehr potenter und selektiver Blocker des TTX-resistenten Natriumkanals Na<sub>v</sub>1.8, hat eine halbmaximale Blockierungskonzentration von 8 nmol/l bei einem Hill-Faktor unter 1 (Jarvis M. F. *et al.* 2007).

Ebenfalls Natriumkanal-blockierende Eigenschaften zeigt der Kalziumkanalblocker Prenylamin, ohne dass eine Mutation der Aminosäuren der klassischen Lokalanästhetika-Bindungsstelle die Blockierung aufhebt (Mujtaba M. G. *et al.*, 2002). Viele Antikonvulsiva haben durch ihre blockierende Wirkung am Natriumkanal eine schmerzlindernde Wirkung. Für Phenytoin, Carbamazepin und Lamotrigin fanden Yang und Kuo (Yang Y. C. und Kuo C. C., 2002) eine eigene Bindungsstelle in der Nähe des Kanalporeneingangs.

Die Blockierungen anderer Ionenkanäle durch Lokalanästhetika weisen ebenfalls eine große Steilheit in der Konzentrations-Inhibitionskurve auf, wenn die halbmaximale Blockierungskonzentrationen sehr hoch und der Blocker damit unselektiv ist. So liegt die halbmaximale Blockierungskonzentration von Lidocain bei dem säuresensitiven Ionenkanal ASIC bei 11 mmol/l bei einem Hill-Faktor von 2,7 (Lin J *et al.*, 2011).

## 5 Ausblick

Entscheidend für den effektiven Einsatz Natriumkanal-blockierender Medikamente in der Therapie hyperexcitabler Zustände wie Epilepsie, tachykarde Herzrhythmusstörungen und neuropathische Schmerzsyndrome ist eine gute Affinität zum Natriumkanal und die Fähigkeit einen „use-dependent“ Block hervorzurufen.

Mit den hier gewonnen Erkenntnissen können nun zwei unterschiedliche Blockierungsverhalten beschrieben werden. In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich, dass eine Substanz mit niedriger Affinität zum Natriumkanalmolekül, aber vielen potentiellen Bindungsstellen eine hohe Affinität zu haben scheint, letztlich aber keinen „use-dependent“ Block aufweist, da sie nicht über die klassische Lokalanästhetika-Bindungsstelle am Natriumkanal wirkt. Solche Substanzen kämen für die Therapie nicht in Frage und könnten bereits anhand ihrer Konzentrations-Wirkungsbeziehung identifiziert werden.

## 6 Zusammenfassung

Natriumkanal-blockierende Substanzen haben einen hohen Stellenwert in der Therapie pathologischer Zustände, die mit einer Hyperexcitabilität elektrisch erregbarer Zellen einhergehen wie cerebrale Krampfanfälle, kardiale Arrhythmien oder neuropathische Schmerzsyndrome. Die Interaktion Natriumkanal-blockierender Pharmaka mit dem Natriumkanal ist komplex, da der Natriumkanal in Abhängigkeit seines Erregungszustandes verschiedene Zustandsformen annehmen kann, die unterschiedliche Affinitäten zum Blockermolekül besitzen.

Die Konzentrations-Inhibitionskurven der meisten Natriumkanalblocker weisen einen Hill-Faktor von eins auf, was zu der Annahme führt, dass ein Blockermolekül einen Natriumkanal blockiert. Bei sehr niedrig potenten Blockern ist die Steilheit (Hill-Faktor) der Kurve oft größer; die Ursache hierfür ist unklar.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand bekannter Konzentrations-Inhibitionskurven durch nichtlineare Kurvenanpassung verschiedener Modelle herauszufinden, welcher molekulare Mechanismus für die steilere Konzentrations-Inhibitionskurve bei der Natriumkanalblockade von Bedeutung ist.

Als Grundlage der Arbeit dienten Konzentrations-Inhibitionskurven verschiedener Natriumkanal-blockierender Substanzen aus eigenen und aus Untersuchungen anderer Autoren, die mithilfe der „whole-cell patch clamp“-Technik an TTX-resistenten Natriumströmen in Spinalganglienzellen der Ratte gewonnen wurden.

Die Kurven wurden mit vier verschiedenen Gleichungen angepasst, denen unterschiedliche Blockierungsmodelle zugrunde liegen. Dies sind: A: Hill-Gleichung mit Hill-Faktor eins. B: Wie A mit freiem Hill-Faktor, C: Mehrere Blockermoleküle blockieren den Kanal, wobei alle Moleküle gebunden sein müssen, D: Wie C, wobei die Bindung eines Moleküls ausreicht um den Kanal zu blockieren.

Untersucht wurden die Konzentrations-Inhibitionskurven von 21 Substanzen. Bei 11 Substanzen zeigte sich bei der Anpassung mit der Hill-Gleichung (B) eine Steigung um eins, bei 10 Substanzen war die Steigung größer 1,1. Mit Gleichung D konnte bei 14 Substanzen eine bessere Anpassung erreicht werden, mit Gleichung C bei 4 Substanzen.



Korreliert man die Zahl der Bindungsstellen mit der Ausprägung des „use-dependent“-Blocks, zeigt sich, dass nur Substanzen die an einer oder wenigen Bindungsstellen wirken, einen „use-dependent“ Block aufweisen.

Die Ergebnisse zeigen, dass verschiedene Natriumkanal-blockierende Substanzen unterschiedliche Wirkmechanismen aufweisen können. Die Bindung klassischer Lokalanästhetika an den Natriumkanal lässt sich mit einer einfachen 1:1 Bindung mittlerer Affinität an die bekannte Bindungsstelle in der Natriumkanalpore erklären. Schwach potente Lokalanästhetika scheinen jedoch über mehrere unspezifische Bindungsstellen mit niedriger Affinität zu wirken wobei aufgrund der vielen Bindungsstellen die Affinität höher erscheint. Lokalanästhetika die über diesen Wirkmechanismus wirken, zeigen keinen „use-dependent“ Block. Das Blockierungsmodell erklärt gut die in der Literatur oft zu beobachtenden Abweichungen niedrig potenter Lokalanästhetika von der Hill-Funktion.

## 7 Summary

Sodium channel blocking drugs play a decisive role in the treatment of pathologies associated with hyperexcitation of electrically excitable cells. Examples include antiarrhythmics and local anesthetics in ventricular tachycardia, anticonvulsants for seizures and all together in neuropathic and other chronic pain syndromes. The interaction of sodium channel blocking drugs with the sodium channel is rather complex, because it has various states depending on its activation state. These various states are different in their affinity to the blocker molecule.

To determine the blocking potency of different drugs concentration-inhibition-curves are created and fitted with the Hill-function. The Hill-coefficient for most substances is equal to one, which equates to the reaction of one blocker molecule with one sodium channel. The slope (Hill-factor) of very low potent blockers is often larger and the reason for this is unclear.

The aim of this study was to discover which molecular mechanism for the steeper concentration-inhibition curve of the sodium channel blockade is important, based on nonlinear curve fitting of known concentration-inhibition curves to various models.

Concentration inhibition curves of various sodium channel-blocking agents from my own data and from data of other authors using the whole-cell patch clamp technique on TTX-resistant sodium currents in dorsal root ganglion cells of the rat were investigated. The curves were fitted with four different equations which describe different models of blocking. These are: A: Hill equation with Hill factor one. B: Same as A with free Hill factor. C: Multiple blocker molecules block the channel, wherein all of the molecules must be bound to cause blockage. D: Similar to C, but where the binding of a single molecule is sufficient to block the channel: The concentration-inhibition curves of 21 substances were investigated.

For 11 compounds the fitting using the Hill equation (B) had a slope by one. 10 substances showed a slope greater than 1.1. Using equation D, 14 substances showed an improved fit, with equation C only 4 substances. Correlation of the number of binding sites with the degree of the use-dependent block shows that only substances acting with one or few binding sites present a use-dependent block.

The results show that different sodium channel-blocking agents may have different mechanisms of action. The binding of local anesthetics to the classical sodium channel can be explained by a simple 1:1 binding with medium affinity to the well-known binding site in the sodium channel pore. Low potent local anesthetics interact with several non-specific binding sites with low affinity but with an overall much higher appearing affinity of the channel block. Local anesthetics acting via this mechanism of action show no use dependent block.

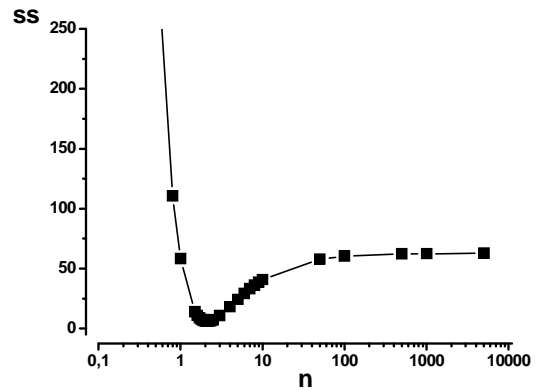
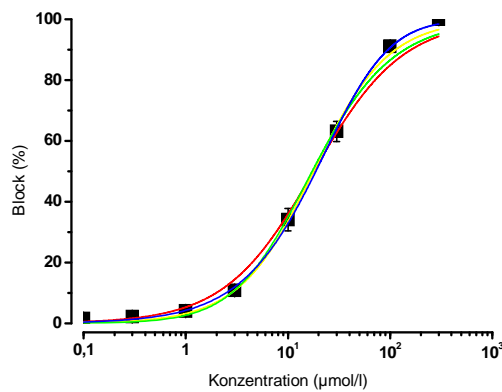
This model of blocking can explain the in literature often observed deviations of low potent local anesthetics from the Hill function.

## 8 Anhang

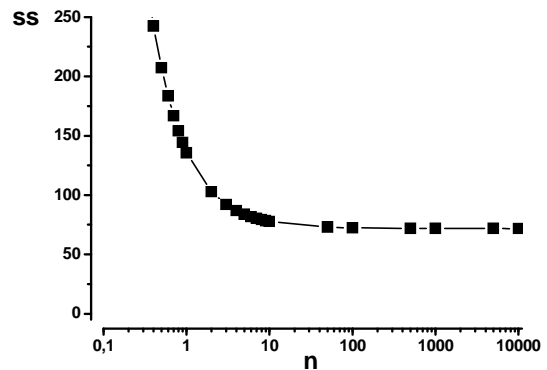
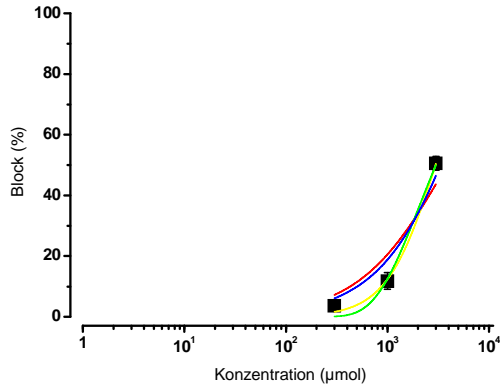
### 8.1 Anhang I:

**Konzentrations-Inhibitionskurven und die Summe der Abweichungsquadrate – „sum of squares (SS)“ in Abhängigkeit der Anzahl der Bindungsstellen für alle untersuchten Substanzen.**

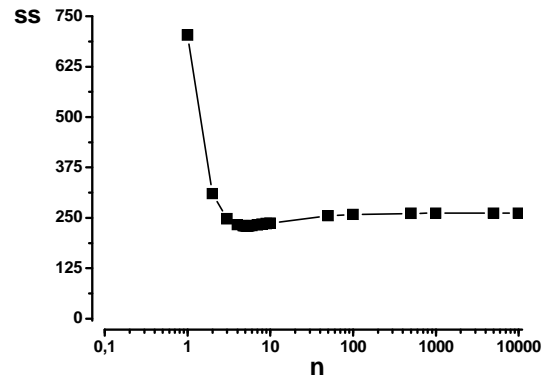
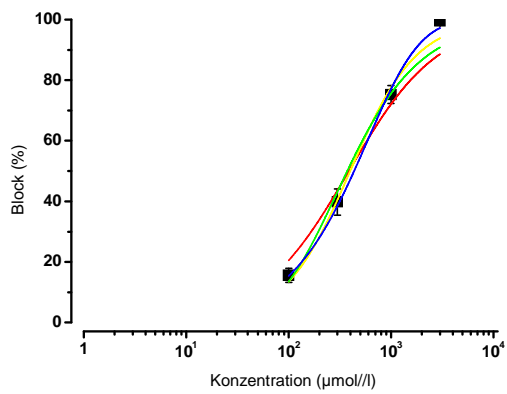
#### 8.1.1 Amitriptylin



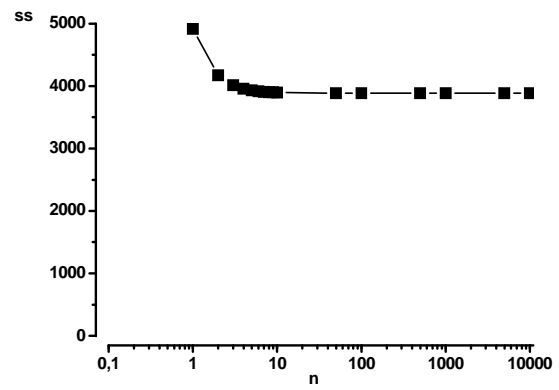
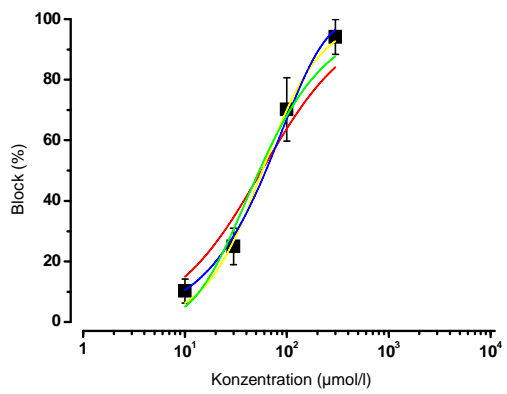
#### 8.1.2 Anilin



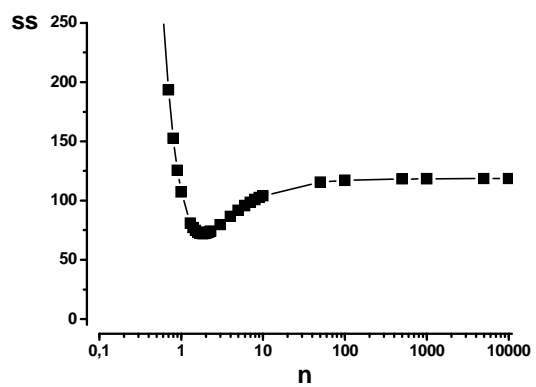
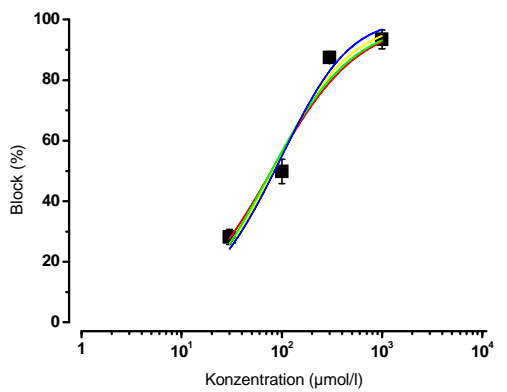
### 8.1.3 Benzocain



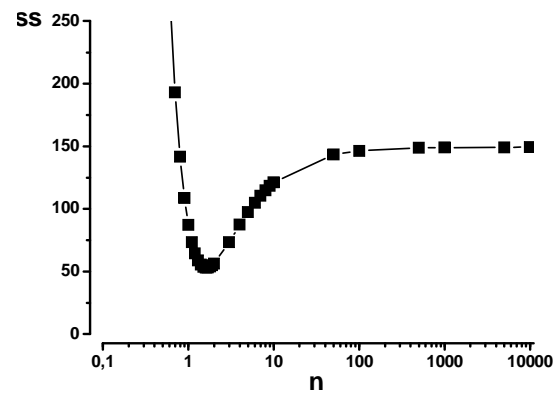
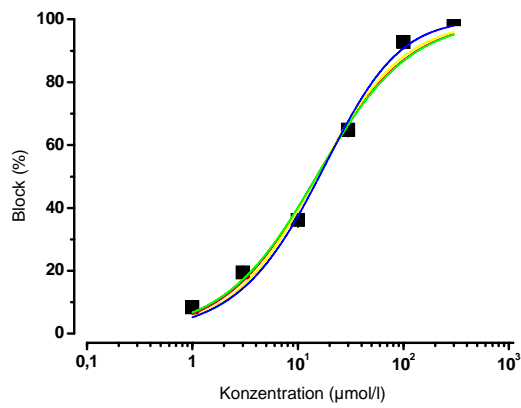
### 8.1.4 Butamben



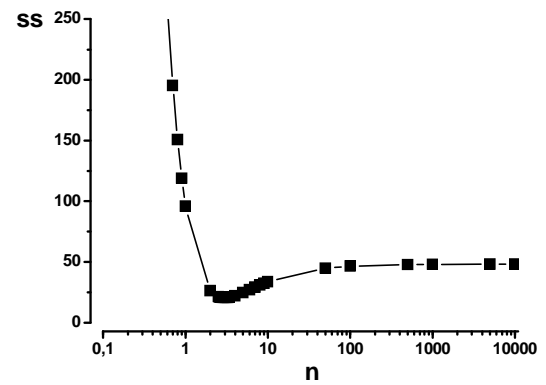
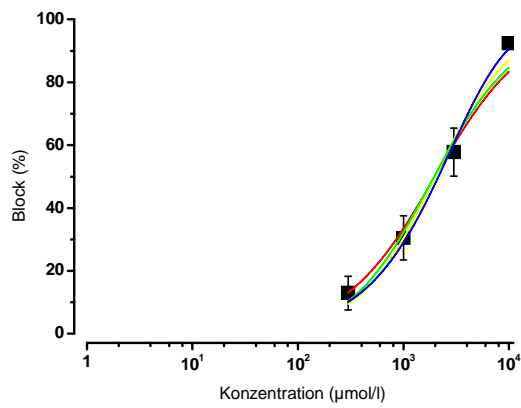
### 8.1.5 Diphenylhydramin



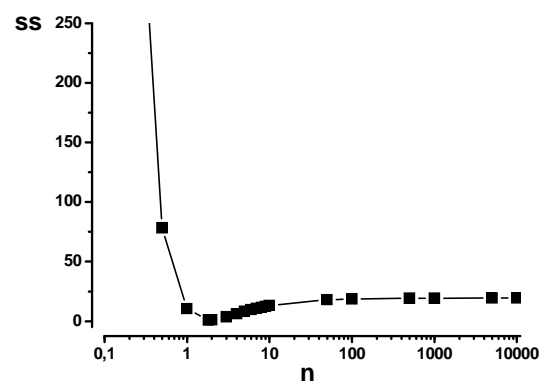
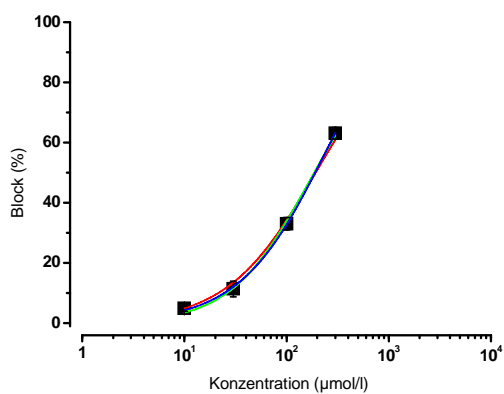
### 8.1.6 Dyclonin



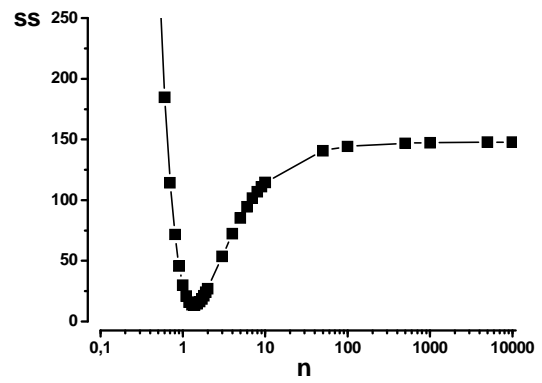
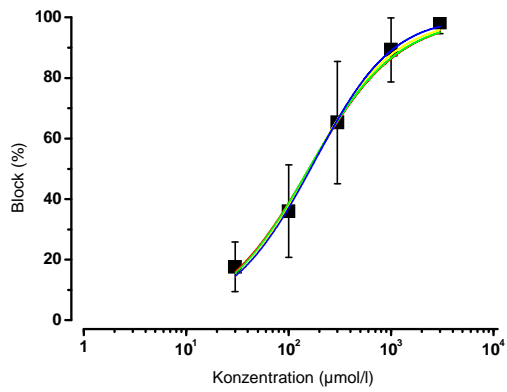
### 8.1.7 Ethylbenzylamin



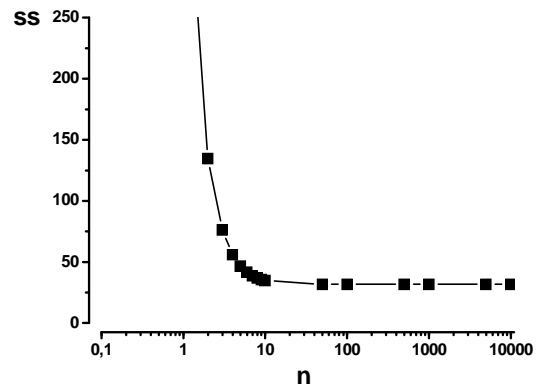
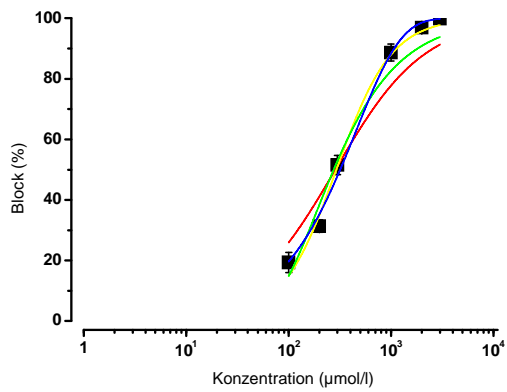
### 8.1.8 Etidocain



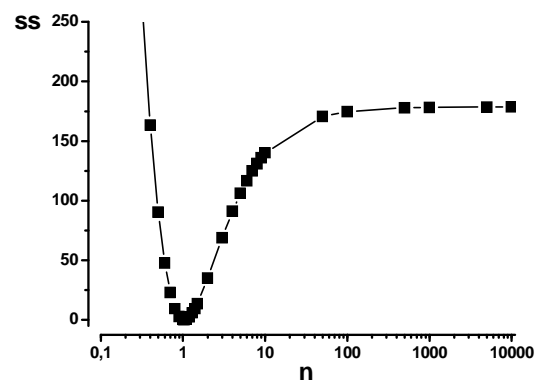
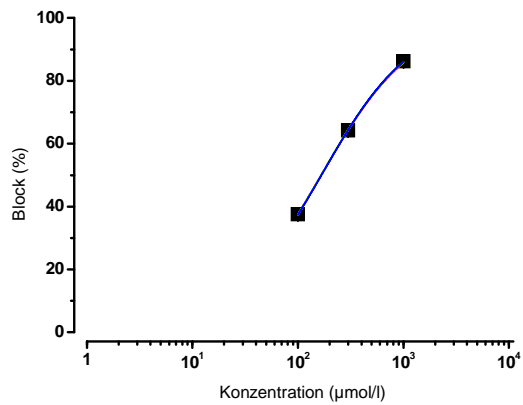
### 8.1.9 Lidocain



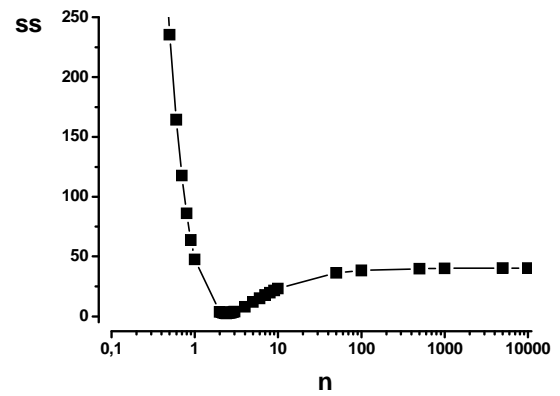
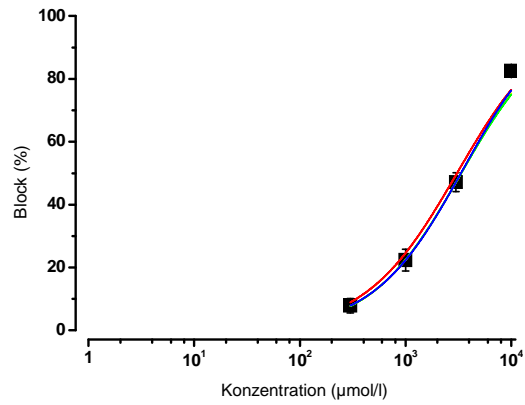
### 8.1.10 Meperidin



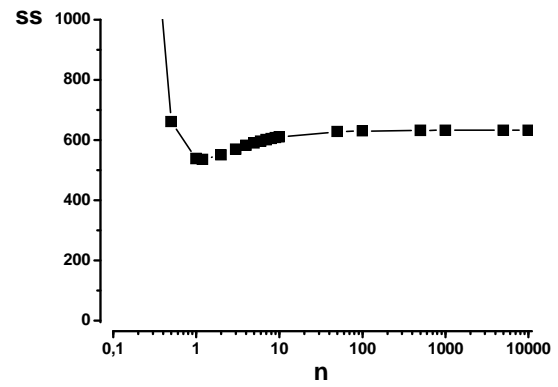
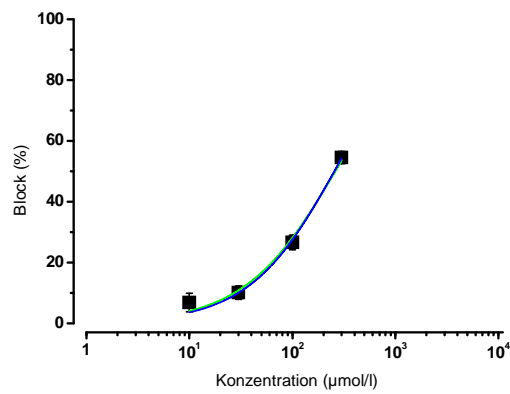
### 8.1.11 Mepivacain



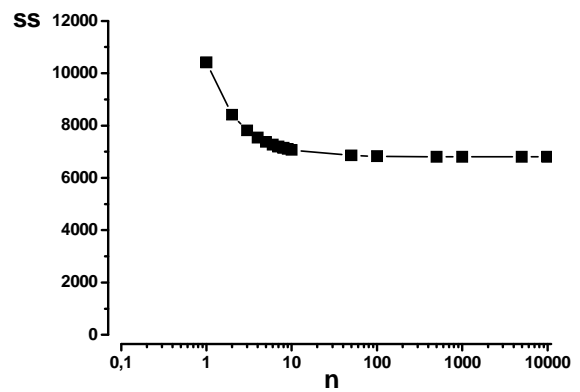
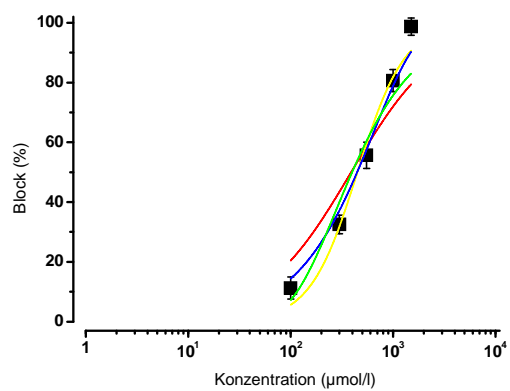
### 8.1.12 Methylbenzylamin



### 8.1.13 Mexiletin

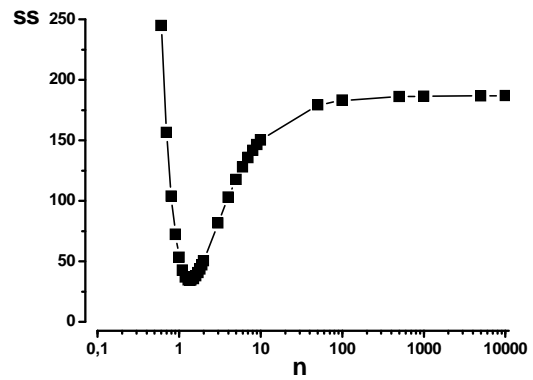
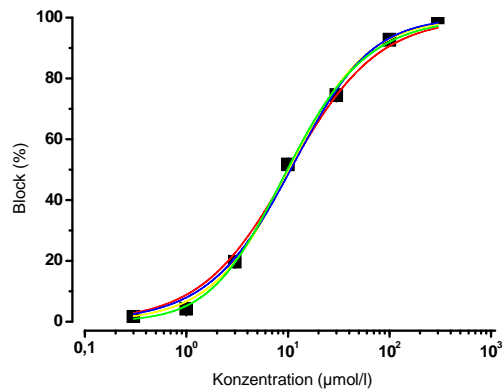


### 8.1.14 Octanol

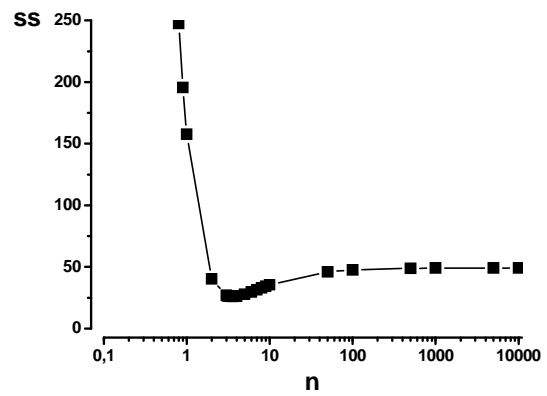
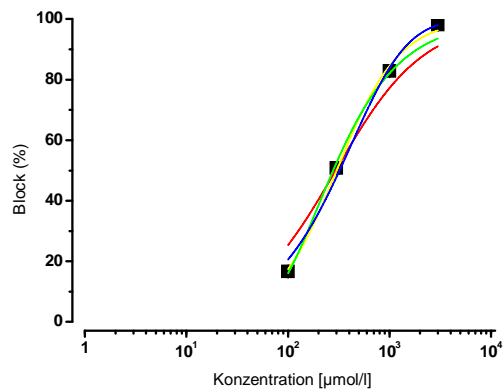




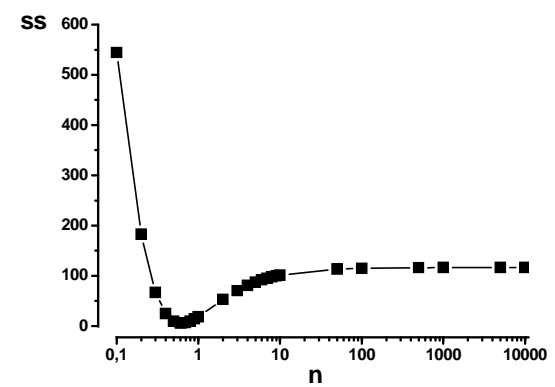
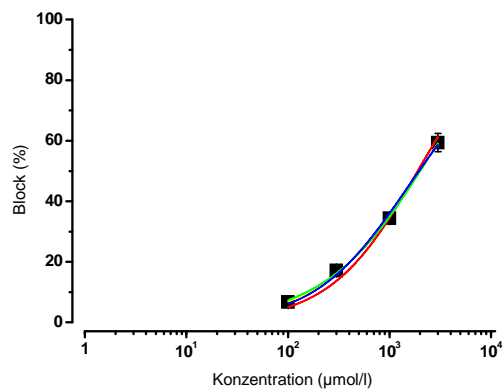
### 8.1.15 Oxybuprocain



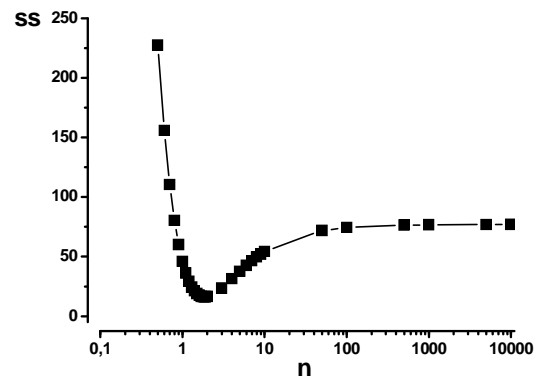
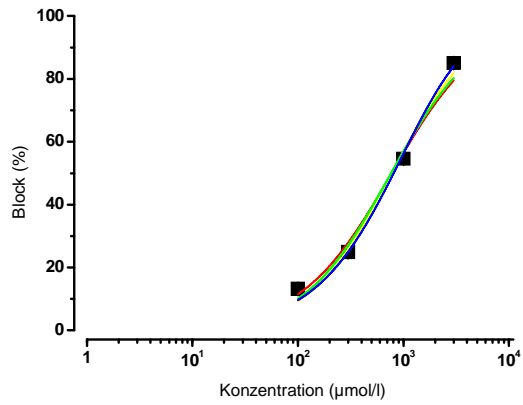
### 8.1.16 Phenylbutylamin



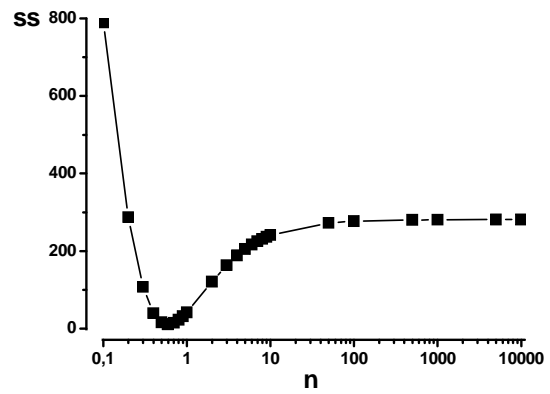
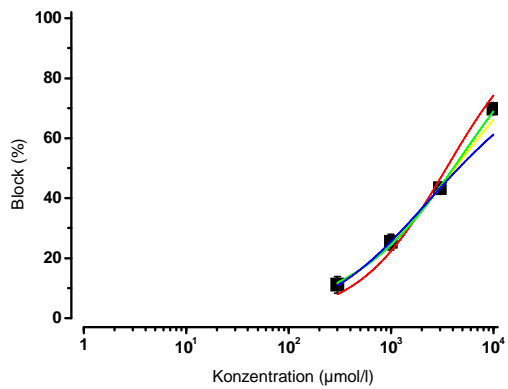
### 8.1.17 Phenylethylamin



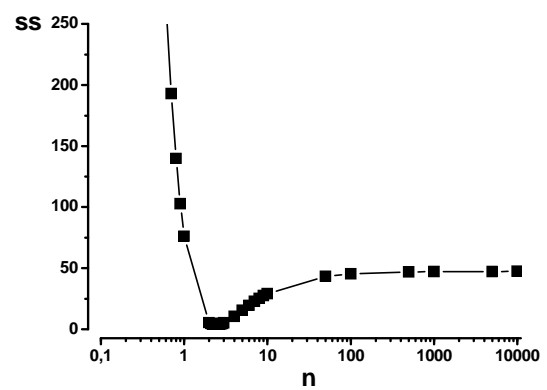
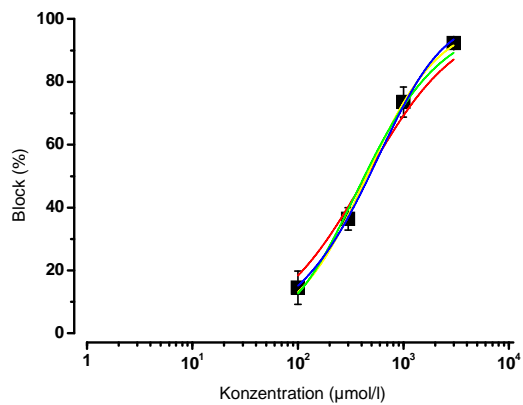
### 8.1.18 Phenylethyldiamin



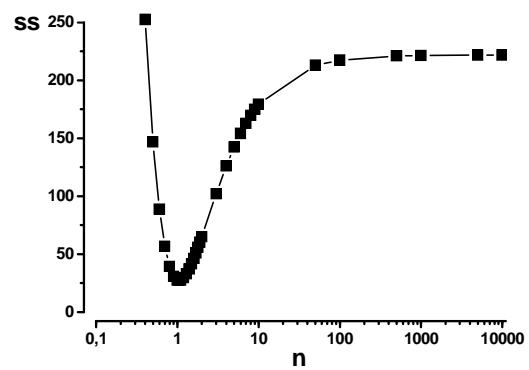
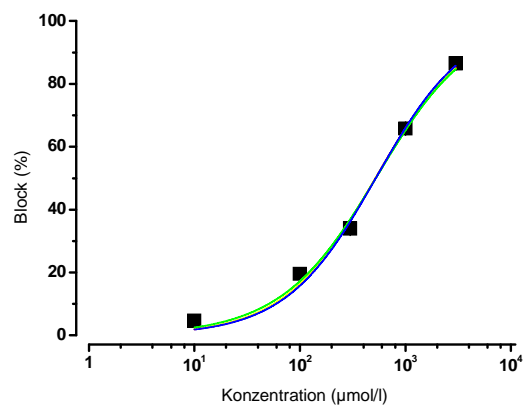
### 8.1.19 Phenylmethyamin



### 8.1.20 Phenylpropylamin



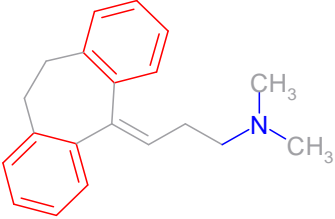
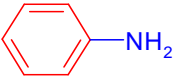
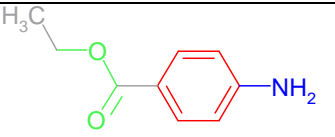
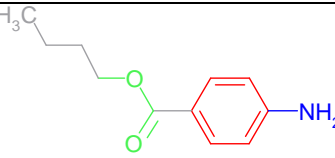
### 8.1.21 Procain

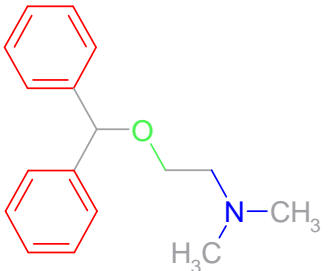
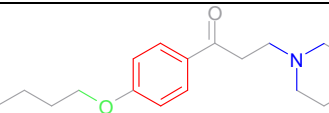
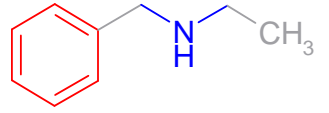
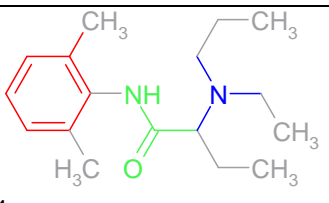
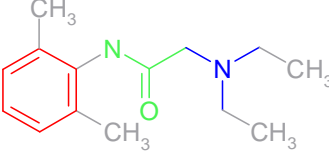
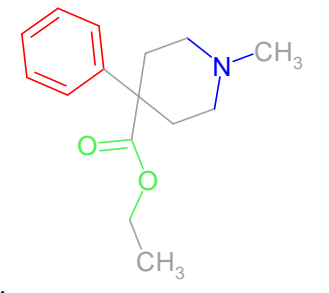


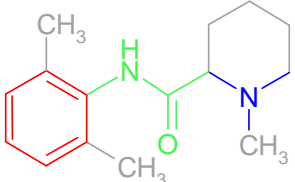
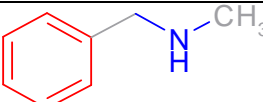
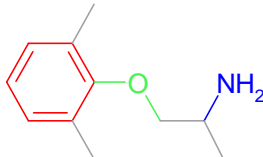

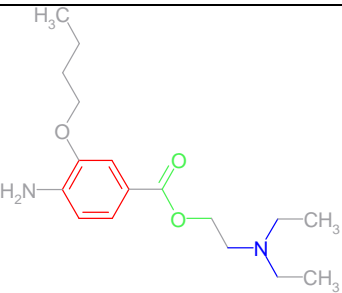
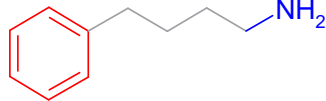
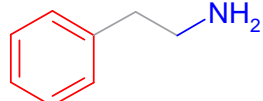
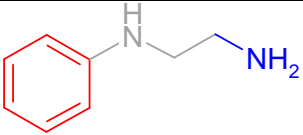
## 8.2 Anhang II:

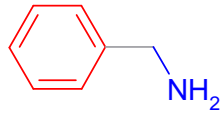
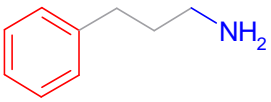
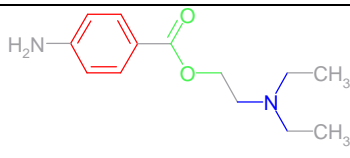
### **Strukturformeln und Biophysikalische Parameter der in der Arbeit untersuchten Substanzen.**

Das Moleküllgewicht (MW) ist in  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  angegeben. Der dimensionslose Partitionskoeffizient  $\log P$  ist ein Maß für die Lipophilie der Substanz. Für lipophile Substanzen ergeben sich Werte  $>0$ . Bei hydrophilen Substanzen ergeben sich negative Werte. Die halbmaximale Blockierungskonzentration ( $\text{IC}_{50}$ ) ist sowohl für den tonischen als auch den phasischen Block in  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  angegeben. Durch Division der tonischen halbmaximalen Blockierungskonzentration durch die phasische ergibt sich das Verhältnis zueinander.  $n(D)$  bezeichnet die den mit Hilfe der Gleichung D errechneten Parameter  $n$ , welcher die Anzahl der potentiellen Bindungsstellen angibt. In den dargestellten Strukturformeln der Substanzen sind funktionell bedeutsame Gruppen farblich hervorgehoben: rot – aromatischer Ring, grün – Esther-, Ether-, Amidbindung, blau: Aminogruppe. Die nebenstehende Zahl gibt den Abstand in Atomen zwischen einem vorhandenen aromatischen Ring und dem Stickstoffatom der Aminogruppe an.

Substanz	$\text{IC}_{50}$ tonisch	$\text{IC}_{50}$ phasisch	tonisch/ phasisch	$n(D)$	Struktur / Abstand Ring - N
Amitriptylin MW: $277,41 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ logP: 4,92	18	2,7	6,7	2,1	 5
Anilin MW: $93,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ logP: 1,20	3860	3268	1,2	510,1	 1
Benzocain MW: $165,19 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ logP: 1,60	387	362	1,1	5,3	 1
Butamben MW: $193,24 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ logP: 2,50	55	44	1,3	38,5	 1

Substanz	IC <sub>50</sub> tonisch	IC <sub>50</sub> phasisch	tonisch/ phasisch	n(D)	Struktur / Abstand Ring - N
Diphenylhydramin MW: 255,36 g·mol <sup>-1</sup> logP: 3,20	78	36	2,2	1,8	 5
Dyclonin MW: 289,41 g·mol <sup>-1</sup> logP: 3,70	15	1,2	12,5	1,6	 4
Ethylbenzylamin MW: 135,21 g·mol <sup>-1</sup> logP: 2,00	1991	1333	1,5	3,0	 2
Etidocain MW: 276,42 g·mol <sup>-1</sup> logP: 3,69	192	37	5,2	1,82	 4
Lidocain MW: 234,34 g·mol <sup>-1</sup> logP: 2,10	158	77	2,1	1,4	 4
Meperidin MW: 247,33 g·mol <sup>-1</sup> logP: 2,60	285	203	1,4	69,8	 4

Substanz	IC <sub>50</sub> tonisch	IC <sub>50</sub> phasisch	tonisch/ phasisch	n(D)	Struktur / Abstand Ring - N
Mepivacain MW: 246,35 g·mol <sup>-1</sup> logP: 1,95	166	79	2,1	1,0	 4
Methylbenzylamin MW: 121,18 g·mol <sup>-1</sup> logP: 1,50	3069	2159	1,4	2,4	 2
Mexiletin MW: 179,26 g·mol <sup>-1</sup> logP: 2,15	258	142	1,8	1,1	 4
Octanol MW: 130,23 g·mol <sup>-1</sup> logP: 3,10	426	392	1,1	672,5	 0
Oxybuprocain MW: 308,42 g·mol <sup>-1</sup> logP: 3,10	10	1,4	7,1	1,4	 5
Phenylbutylamin MW: 149,23 g·mol <sup>-1</sup> logP: 2,20	295	201	1,5	3,6	 5
Phenylethylamin MW: 121,18 g·mol <sup>-1</sup> logP: 1,30	1897	1040	1,8	0,6	 3
Phenylethyldiamin MW: 136,19 g·mol <sup>-1</sup> logP: 0,90	773	355	2,2	1,9	 4

Substanz	IC <sub>50</sub> tonisch	IC <sub>50</sub> phasisch	tonisch/ phasisch	n(D)	Struktur / Abstand Ring - N
Phenylmethyamin MW: 107,15 g·mol <sup>-1</sup> logP: 1,10	3713	2644	1,8	0,6	 2
Phenylpropylamin MW: 135,21 g·mol <sup>-1</sup> logP: 1,70	445	383	1,2	2,4	 4
Procain MW: 236,31 g·mol <sup>-1</sup> logP: 2,14	518	208	2,5	1,0	 5

## 9 Literatur

**Bisswanger H (2000):** Enzymkinetik: Theorie und Methoden, 3. ed. Wiley-VCH, Weinheim.

**Bräu ME (1998):** Pharmakologie Tetrodotoxin-resistenter Natriumkanäle: Bedeutung in der anästhesiologischen Schmerztherapie. *Habilitationsschrift im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.*

**Bräu ME, Koch ED, Vogel W, Hempelmann G (2000):** Tonic blocking action of meperidine on Na<sup>+</sup>- and K<sup>+</sup>-channels in amphibian peripheral nerves. *Anesthesiology* 92, 147 - 155.

**Dost FH (1953):** Der Blutspiegel: Kinetik der Konzentrationsabläufe in der Kreislaufflüssigkeit. *Thieme Verlag, Leipzig.*

**Dreimann M (2001):** Therapeutika des neuropathischen Schmerzes blockieren den TTX-resistenten Natriumkanal des peripheren nozizeptiven Systems. *Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.*

**Häfner S (2003):** Strukturelle und physikochemische Determinanten von Substanzen für die Blockade TTX-resistenter Natriumkanäle. *Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.*

**Hilal SH, Carreira LA, Karickhoff SW (2003):** Prediction of the Vapor Pressure, Boiling Point, Heat of Vaporization and Diffusion Coefficient of Organic Compounds. *Quant Struct Act Relat* 556 (22).

**Huser J (Hg.) (1589):** Bücher und Schriften des edlen, hochgelahrten und bewehrten philosophi medici, P.T.B.V.H. Paracelsi genannt (10 Bände). *Basel.*

**Jarvis MF, Honore P, Shieh CC, Chapman M, Joshi S, Zhang XF, Kort M, Carroll W, Marron B, Atkinson R, Thomas J, Liu D, Krambis M, Liu Y, McGaraughty S, Chu K, Roeloffs R, Zhong C, Mikusa JP, Hernandez G, Gauvin D, Wade C, Zhu C, Pai M, Scanio M, Shi L, Drizin I, Gregg R, Matulenko M, Hakeem A, Gross M, Johnson M, Marsh K, Wagoner PK, Sullivan JP, Faltynek CR, Krafte DS (2007):** A-803467, a potent and selective Na<sub>v</sub>1.8 sodiumchannel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *PNAS* 104 (20), 8520 - 8525.



**Kerkmann H (2005):** Differentielle Interaktionen hochpotenter Lokalanästhetika mit TTX-sensitiven und TTX-resistenten Natriumströmen an Spinalganglienzellen der erwachsenen Ratte. *Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.*

**Lautenschläger K-H, Schröter W, Wanninger A (2005):** Taschenbuch der Chemie, 20. überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main.

**Leffler A, Frank G, Kistner K, Niedermirtl F, Koppert W, Reeh PW, Nau C (2012):** Local anaesthetic-like inhibition of voltage-gated Na<sup>+</sup> channels by the partial  $\mu$ -opioid receptor agonist Buprenorphine. *Anesthesiology* 116, 1355 - 1366.

**Lin J, Chu X, Maysami S, Li M, Si H, Cotrell JE, Simon RP, Siong Z (2011):** Inhibition of acid sensing ion channel currents by lidocaine in cultured mouse cortical neurons. *Anesth Analg* 112 (4), 977 - 981.

**Lipkind GM & Fozzard HA (2005):** Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels. *Mol Pharmacol* 68, 1611 - 1622.

**Meeder T & Ulbricht W (1987):** Action of benzocaine on sodium channels of frog nodes of Ranvier treated with chloramine-T. *Pflugers Arch* 409 (3), 265 - 273.

**Mujtaba MG, Wang SY, Wang GK (2002):** Prenylamine block of Nav1.5 channel is mediated via a receptor distinct from that of local anesthetics. *Mol Pharmacol* 62, 415 - 422.

**Pullmann M (2003):** Dynamische Blockierung TTX-resistenter Natriumkanäle durch Lokalanästhetika. *Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.*

**Ragsdale DS, McPhee JC, Scheuer T, Catterall WA (1994):** Molecular determinants of state-dependent block of Na<sup>+</sup>-channels by local anesthetics. *Science* 265, 1724 - 1728.

**Sato C, Ueno Y, Asai K, Takahashi K, Sato M, Engel A, & Fujiyoshi Y (2001):** The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* 409, 1047 - 1051.

**Schorer EL (2004):** Die Wirkung von Pethidin und Lidocain an Tetrodotoxin-resistenten Natriumkanälen isolierter Spinalganglienzellen der erwachsenen Ratte. *Dissertation im Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.*

**Ueno Y & Sato C (2001):** Three-dimensional reconstruction of single particle electron microscopy: the voltage sensitive sodium channel structure. *Sci Prog* 84, 291 - 309.

**Weiss JN (1997):** The Hill equation revisited: uses and misuses. *FASEB J.* 11, 835 - 841.

**Yang YC & Kuo CC (2002):** Inhibition of Na<sup>(+)</sup> current by imipramine and related compounds: different binding kinetics as an inactivation stabilizer and as an open channel blocker. *Mol Pharmacol* 62, 1228 - 1237.

**Yarov-Yarovoy V, McPhee JC, Idsvoog D, Pate C, Scheuer T, Catterall WA (2002):** Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the Na<sup>+</sup>-channel alpha subunit in voltage-dependent gating and drug block. *J Biol Chem* 277, 35393 - 35401.

**Ich erkläre:**

*Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.*

## **Danksagung:**

Mein besonderer Dank gilt

### **PD Dr. med. Michael E. Bräu**

für die exzellente Ausbildung und Anleitung im Rahmen meiner Promotionen, für die umfassende Betreuung mit Familienanschluss und die Motivation in den letzten 14 Jahren.

### **Prof. Dr. rer. nat. Werner Vogel, PD Dr. med. Andreas Scholz und allen Mitarbeitern und Mitstreitern des Labors**

für die Unterstützung, konstruktive Diskussionen, die Bereitstellung eines elektrophysiologischen Arbeitsplatzes und eine sehr gute Zusammenarbeit.

### **meinen Freunden und Kollegen**

für eine angenehmes Arbeitsklima und eine schöne gemeinsame Zeit.

### **meinen Eltern**

für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

### **meiner Frau und meinem Sohn,**

die viele Stunden auf mich verzichtet haben und mein Leben bereichern.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN: 978-3-8359-6065-7



9 78 3 8359 6065 7